



Faculté de Médecine et des Sciences de la santé
Département de Médecine nucléaire et radiobiologie

**IMAGERIE DYNAMIQUE DES PROCESSUS MÉTABOLIQUES TRANSITOIRES
À L'AIDE DE LA TOMOGRAPHIE D'ÉMISSION PAR POSITRONS (TEP)
ANIMALE DANS L'ÉVALUATION DE PHOTOSENSIBILISATEURS POUR
LA THÉRAPIE PHOTODYNAMIQUE DU CANCER (TPD)**

Mémoire par article présenté en vue de l'obtention du grade de
Maître ès Science (M.Sc.)

Rédigé par
Véronique Bérard

Décembre 2006



Library and
Archives Canada

Bibliothèque et
Archives Canada

Published Heritage
Branch

Direction du
Patrimoine de l'édition

395 Wellington Street
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

395, rue Wellington
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

Your file Votre référence

ISBN: 978-0-494-25946-7

Our file Notre référence

ISBN: 978-0-494-25946-7

NOTICE:

The author has granted a non-exclusive license allowing Library and Archives Canada to reproduce, publish, archive, preserve, conserve, communicate to the public by telecommunication or on the Internet, loan, distribute and sell theses worldwide, for commercial or non-commercial purposes, in microform, paper, electronic and/or any other formats.

The author retains copyright ownership and moral rights in this thesis. Neither the thesis nor substantial extracts from it may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

AVIS:

L'auteur a accordé une licence non exclusive permettant à la Bibliothèque et Archives Canada de reproduire, publier, archiver, sauvegarder, conserver, transmettre au public par télécommunication ou par l'Internet, prêter, distribuer et vendre des thèses partout dans le monde, à des fins commerciales ou autres, sur support microforme, papier, électronique et/ou autres formats.

L'auteur conserve la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent cette thèse. Ni la thèse ni des extraits substantiels de celle-ci ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms may have been removed from this thesis.

Conformément à la loi canadienne sur la protection de la vie privée, quelques formulaires secondaires ont été enlevés de cette thèse.

While these forms may be included in the document page count, their removal does not represent any loss of content from the thesis.

Bien que ces formulaires aient inclus dans la pagination, il n'y aura aucun contenu manquant.


Canada

TABLE DES MATIÈRES

LISTE DES ILLUSTRATIONS	IV
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	VI
RÉSUMÉ	VII
INTRODUCTION	1
1 - Thérapie photodynamique (TPD).....	1
1.1 - Principe général de la thérapie photodynamique du cancer	3
1.2 - Agents photosensibilisateurs et applications de la thérapie photodynamique	5
1.3 - Mécanismes d'action de la TPD	10
2 - Tomographie d'émission par positrons (TEP)	13
2.1 - Principe général de la TEP	13
2.2 - Applications de l'imagerie TEP	15
2.3 - Mesure du métabolisme tumoral	19
2.4 - Mesure d'autres paramètres tumoraux	22
2.4.1 - Flot sanguin	22
2.4.2 - Prolifération cellulaire	25
HYPOTHÈSE ET OBJECTIFS DE L'ÉTUDE	27
PRÉSENTATION DES TRAVAUX	29
1 - Article 1 : "Positron Emission Tomography Imaging of Tumor Response After Photodynamic Therapy"	29
2 - Article 2 : "Dynamic Imaging of Transient Metabolic Processes by Small-Animal PET for the Evaluation of Photosensitizers in Photodynamic Therapy of Cancer"	51
3 - Imagerie TEP en temps réel du flot sanguin tumoral lors de la TPD	76
3.1 - Matériels et méthodes	79

3.2 - Résultats	79
3.2.1 - [^{13}N]- NH_3	79
3.2.2 - [^{64}Cu]-PTSM	80
3.3 - Discussion	85
3.3.1 - [^{13}N]- NH_3	85
3.3.2 - [^{64}Cu]-PTSM	85
DISCUSSION GÉNÉRALE ET OPTIMISATION DES TRAVAUX	90
PERSPECTIVES D'AVENIR	94
CONCLUSION	98
REMERCIEMENTS	101
BIBLIOGRAPHIE	102
ANNEXES	113

LISTE DES ILLUSTRATIONS

Figure 1 -	Étapes de la thérapie photodynamique du cancer (TPD)	4
Figure 2 -	Diagramme de Jablonski: de l'excitation d'un photosensibilisateur jusqu'à l'oxydation d'un substrat biologique.....	5
Figure 3 -	Transport, distribution et mécanisme d'action des photosensibilisateurs $ZnPcS_2$ et $AlPcS_4$ au niveau du tissu tumoral	12
Figure 4 -	Principe de la tomographie d'émission par positrons.....	14
Figure 5 -	Représentation schématique du transport et du métabolisme du $[^{18}F]$ -FDG dans les tissus.....	20
Figure 6 -	Distribution normale du $[^{18}F]$ -FDG chez un rat portant des tumeurs sous les pattes avant	21
Figure 7 -	Captation cellulaire du $[^{64}Cu]$ -PTSM.....	23
Figure 8 -	Image TEP de la distribution du $[^{62}Cu]$ -PTSM chez un patient sain	24
Figure 9 -	Imagerie TEP de la prolifération cellulaire avec le $[^{18}F]$ -FLT	26
Figure 10 -	Représentation des changements relatifs dans le flot sanguin tumoral avant, pendant et après la TPD chez une souris par spectroscopie DCS	77
Figure 11 -	Étapes du protocole expérimental menant à l'imagerie TEP en temps réel du flot sanguin tumoral lors de la TPD	79
Figure 12 -	Imagerie TEP en temps réel avec le $[^{13}N]$ - NH_3 injecté en continu à 2 reprises; TPD faite avec le photosensibilisateur Photofrin [®]	80
Figure 13 -	Biodistribution du $[^{64}Cu]$ -PTSM faite par dissection d'un rat suite à une infusion en continu de 2 heures	81
Figure 14 -	Biodistributions du $[^{64}Cu]$ -PTSM faites par imagerie TEP chez des rats 2 heures suite à une injection sous forme de bolus.....	82
Figure 15 -	Imagerie TEP en temps réel avec le $[^{64}Cu]$ -PTSM injecté en continu pendant 2 heures; TPD faite avec le photosensibilisateur $AlPcS_4$	83

Figure 16 - Mesure de l'élimination sanguine du [^{64}Cu]-PTSM injecté en continu pendant 2 heures à l'aide d'un compteur sanguin microvolumétrique	84
Figure 17 - Imagerie TEP avec le [^{64}Cu]-PTSM (A) 6 minutes et (B) 20 heures post-injection chez la souris	87
Tableau 1 - Liste de quelques photosensibilisateurs utilisés en clinique.....	9
Tableau 2 - Radiotraceurs utilisés lors d'études oncologiques à l'aide de la TEP	15

LISTE DES ABRÉVIATIONS

$\Delta 1$	Délai de réponse
$\Delta 2$	Délai de récupération
AlPcS ₄	Aluminium phtalocyanine tétrasulfonée
β^+	Particule Bêta plus ou Positron
β^-	Particule Bêta moins
Cu	Cuivre
DCS	Spectroscopie par corrélation diffuse (« Diffuse Contrast Spectroscopy »)
[¹⁸ F]-FDG ou FDG	2-déoxy-2-[¹⁸ F]-fluoro-D-glucose
[¹⁸ F]-FLT ou FLT	[¹⁸ F]déoxyfluorothymidine
I.V.	Intraveineuse
LDL	Lipoprotéines de basse densité (« Low Density Lipoproteins »)
MAC	Adénocarcinome mammaire (« Mammary Adenocarcinoma »)
MLEM	Maximisation de l'attente du maximum de vraisemblance (« Maximum Likelihood Expectation Maximization »)
[¹³ N]-NH ₃ ou NH ₃	Ammoniac marqué à l' ¹³ Azote
Pc	Phtalocyanine
PS	Photosensibilisateur
PTSM	Pyruvaldéhyde-bis(N ⁴ -méthylthiosemicarbazone)
TEP	Tomographie d'émission par positrons
TPD (PDT)	Thérapie photodynamique du cancer
^{99m} Tc-MIBI	Méthoxyisobutylisonitrile marqué au ^{99m} Technécium
ZnPcS ₂	Zinc phtalocyanine disulfonée

RÉSUMÉ

La tomographie d'émission par positrons (TEP) est un outil d'imagerie moléculaire puissant et non invasif permettant d'étudier *in vivo* des processus physiologiques et moléculaires, tant au niveau cardiaque, cérébral qu'oncologique. En oncologie clinique, la TEP est surtout utilisée pour détecter des tumeurs cancéreuses et évaluer leur réponse à diverses thérapies. Au niveau de la recherche pré-clinique en oncologie, cette modalité d'imagerie moléculaire prometteuse est portée à jouer un rôle important dans le développement de nouveaux protocoles de traitement. Le radiotracer le plus utilisé pour évaluer le métabolisme tumoral du glucose est le 2-deoxy-2-[^{18}F]-fluoro-D-glucose ([^{18}F]-FDG).

La thérapie photodynamique (TPD) est de plus en plus employée dans le traitement de certains cancers. La TPD nécessite la présence combinée de photosensibilisateurs (PS) localisés dans les tumeurs, de lumière à une longueur d'onde appropriée et d'oxygène moléculaire afin d'induire des dommages oxydatifs aux tissus tumoraux. La thérapie photodynamique peut amener une régression tumorale selon deux mécanismes d'action différents. Elle peut engendrer la mort des cellules tumorales directement, alors qu'elle peut aussi endommager la vascularisation de la tumeur amenant une mort indirecte des cellules malignes. La contribution relative de ces deux principaux mécanismes d'action sur la réponse tumorale dépend de la distribution du photosensibilisateur au niveau des compartiments cellulaires ou vasculaires de la tumeur qui à son tour, dépend de la nature chimique de celui-ci. Les PS amphiphiles, comme la phtalocyanine ZnPcS_2 , sont préférentiellement transportés par des lipoprotéines qui pénètrent directement dans les cellules tumorales, alors que les PS hydrophiles tels que la phtalocyanine AlPcS_4 sont

principalement transportés par la protéine albumine et sont déposés dans le stroma vasculaire de la tumeur. Il s'ensuit que la TPD faite avec le ZnPcS_2 induit plutôt une mort cellulaire directe, alors que l'emploi du AlPcS_4 affectera en premier lieu le système vasculaire de la tumeur amenant une mort cellulaire indirecte par la suite.

Étant donné que l'application de la thérapie photodynamique occasionne très rapidement des effets au niveau des tumeurs traitées, la tomographie d'émission par positrons pourrait certes être un outil idéal pour étudier les réponses biochimiques et physiologiques au niveau des tumeurs tôt suite à ce traitement. L'imagerie TEP avec le ^{18}F -FDG s'est effectivement avérée être une méthode prometteuse dans l'étude des effets de la thérapie photodynamique du cancer *in vivo*, soit dans l'évaluation de l'efficacité d'un photosensibilisateur ou dans la détermination de son mécanisme d'action. Des travaux antérieurs en ont montré le potentiel en procédant à des scans à différents temps après la TPD pour mesurer la captation tumorale du ^{18}F -FDG, injecté sous forme de bolus. Toutefois, cette approche conventionnelle ne donne pas d'informations sur les processus biologiques transitoires impliqués dans la destruction des cellules tumorales, c'est-à-dire les processus survenant durant et immédiatement après l'illumination. Ce mémoire illustre donc une nouvelle approche utilisant l'imagerie TEP, avec infusion continue du radiotracer ^{18}F -FDG, pour l'évaluation en temps réel de la réponse tumorale à la TPD chez le rat. De façon plus spécifique, le mécanisme d'action de différents photosensibilisateurs sera investigué en fonction des processus métaboliques transitoires observés durant et immédiatement après l'illumination. De plus, afin de mieux comprendre les processus physiologiques impliqués dans l'avènement de certains changements métaboliques, des études TEP en temps réel

évaluant le flot sanguin tumoral durant la TPD ont aussi été amorcées avec les radiotraceurs $[^{13}\text{N}]\text{-NH}_3$ et $[^{64}\text{Cu}]\text{-PTSM}$.

En somme, nous avons réussi à démontrer la faisabilité d'utiliser l'imagerie TEP en temps réel avec des infusions continues de $[^{18}\text{F}]\text{-FDG}$ afin d'étudier la réponse métabolique tumorale durant la thérapie photodynamique chez un modèle de rongeur. Cette méthode s'est avérée très pertinente dans l'étude des changements métaboliques transitoires survenant au niveau tumoral et systémique pendant et tout de suite après la TPD, particulièrement pour la caractérisation des mécanismes d'action de différents photosensibilisateurs. En effet, l'observation de différences significatives au niveau des profils de captation du $[^{18}\text{F}]\text{-FDG}$ procure une façon rapide de distinguer entre un mécanisme de destruction directe ou indirecte des cellules tumorales et ce, en temps réel. En plus de visualiser la réponse métabolique tumorale à la thérapie photodynamique, cette procédure d'imagerie TEP en temps réel pourrait aussi être appliquée à l'étude des changements du flot sanguin tumoral pendant la TPD, ainsi qu'à l'étude de mécanismes de réponse spécifiques tels que les processus apoptotiques.

Mots clés : Thérapie photodynamique du cancer (TPD), Tomographie d'émission par positrons (TEP), Processus métaboliques transitoires, Mécanismes d'action des photosensibilisateurs, Flot sanguin tumoral

INTRODUCTION

La tomographie d'émission par positrons (TEP) est une technologie d'imagerie fonctionnelle grandissante dans les domaines de la cardiologie, la neurologie et l'oncologie, dans l'étude de plusieurs maladies et dans le développement de nouveaux traitements. En oncologie clinique, la TEP est très utilisée afin de détecter des tumeurs cancéreuses et évaluer leur réponse à diverses thérapies alors qu'en recherche pré-clinique, elle peut contribuer à l'élaboration ou à l'optimisation de différents protocoles de traitements contre le cancer. La thérapie photodynamique (TPD) s'avère prometteuse dans la lutte contre certains cancers. Elle nécessite la présence simultanée de trois composantes au niveau des tumeurs à traiter, soit celle de molécules de photosensibilisateurs, d'oxygène et de lumière visible à une longueur d'onde précise. L'étude de l'efficacité et des mécanismes d'action de la TPD sur les tumeurs est maintenant rendue possible à l'aide de l'imagerie TEP.

Alors nous aborderons tout d'abord plus en détails le fonctionnement de la thérapie photodynamique et celui de la tomographie d'émission par positrons, pour ensuite montrer l'utilité de la TEP dans l'étude des mécanismes d'action de différents photosensibilisateurs pour la TPD. En effet, les effets transitoires sur le métabolisme et la perfusion des tumeurs survenant durant la TPD seront étudiés à l'aide de l'imagerie TEP en temps réel.

1 - Thérapie photodynamique (TPD)

On estime que 153 100 nouveaux cas de cancers et 70 400 décès causés par cette maladie surviendront au Canada en 2006. De plus, d'après les taux d'incidence et de mortalité

actuels au Canada, 38% des femmes et 44% des hommes seront atteints d'un cancer au cours de leur vie et environ 1 Canadien sur 4 en mourra (SOCIÉTÉ CANADIENNE DU CANCER). Les thérapies traditionnelles contre le cancer sont la chirurgie, la radiothérapie et la chimiothérapie, mais elles impliquent une délicate marge entre enlever ou détruire le tissu malade et épargner les cellules saines environnantes. Ces traitements conventionnels engendrent donc souvent de sérieux effets secondaires chez les patients. Par conséquent, le développement de nouveaux protocoles de traitement montrant une plus grande sélectivité pour le tissu malade est très important (SHARMAN et al., 1999). La thérapie photodynamique (TPD), aussi connue sous le nom de photochimiothérapie, est l'un des traitements très prometteurs dans la lutte contre certains types de cancers. Ce type de thérapie nécessite la présence d'agents photosensibilisateurs se localisant dans les tissus tumoraux, de la lumière visible ainsi que de l'oxygène moléculaire pour y induire des dommages oxydatifs (DOUGHERTY, 1987; HENDERSON et DOUGHERTY, 1992). La double sélectivité de la thérapie photodynamique se traduit par la captation préférentielle du photosensibilisateur par le tissu néoplasique et par la possibilité de limiter l'activation du PS dans ce tissu en restreignant l'illumination sur cette région spécifique (SHARMAN et al., 1999). Cela permet donc la destruction de la tumeur avec un minimum d'effets néfastes sur les tissus normaux, un avantage très important dans la lutte contre le cancer (DEROSA et CRUTCHLEY, 2002). De plus, contrairement à la radiothérapie et la chimiothérapie, la TPD a un faible potentiel mutagène et, excepté une certaine phototoxicité de la peau, elle comporte des effets secondaires négligeables (MOAN et PENG, 2003). Aussi le développement d'une résistance tumorale chez des patients soumis aux thérapies traditionnelles peut représenter un autre avantage de traiter avec la TPD (CAPELLA et

CAPELLA, 2003). Par contre, les tumeurs traitables par la TPD sont seulement celles pouvant être irradiées de façon externe ou interne par endoscopie, limitant ainsi les types de cancers pouvant être traités (DETTY et al., 2004). Donc la TPD ne peut pas traiter un cancer à un stade tellement avancé qu'il est disséminé dans l'organisme, puisque l'irradiation du corps entier avec des doses appropriées n'est pas possible à ce jour (BROWN et al., 2004). La TPD, combinée à des interventions chirurgicales, peut tout de même améliorer la qualité de vie et même prolonger la survie de patientes chez qui le cancer des ovaires s'est répandu au niveau de la cavité abdominale par exemple (DELANEY et al., 1993; HENDREN et al., 2001).

1.1 - Principe général de la thérapie photodynamique du cancer

La thérapie photodynamique du cancer implique la localisation préférentielle de molécules de photosensibilisateurs dans les tumeurs avant de procéder à leur illumination en employant une longueur d'onde se situant dans le spectre d'absorption du photosensibilisateur utilisé (HENDERSON et DOUGHERTY, 1992). Chaque composante appliquée individuellement est non dommageable mais leur combinaison, en présence d'oxygène, l'est énormément. En effet, des espèces réactives (e.g. oxygène singulet) sont générées et engendrent une cascade de réponses biochimiques qui détruisent les cellules cancéreuses directement ou indirectement via la destruction des vaisseaux sanguins les irriguant, dépendamment de la localisation des molécules de photosensibilisateurs (DOUGHERTY, 1987). (Figure 1)

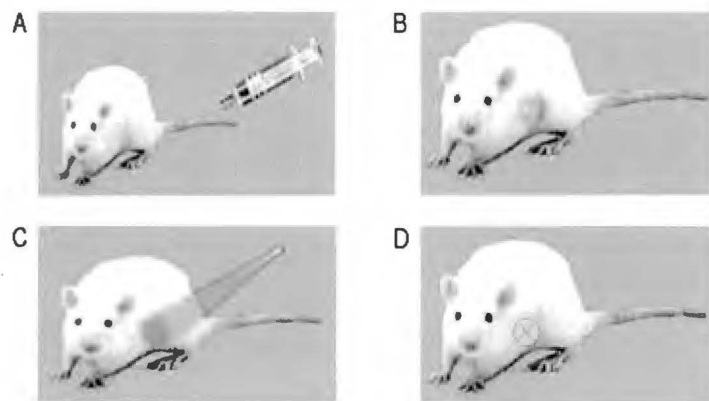


Figure 1 - Étapes de la thérapie photodynamique du cancer (TPD)

(A) Administration d'un agent photosensibilisateur (PS) (B) Accumulation et rétention préférentielle dans les tissus tumoraux après plusieurs heures (C) Illumination de la tumeur avec un laser de longueur d'onde appropriée ; Excitation du PS et création d'espèces réactives dont l'oxygène singulet (D) Dommages oxydatifs aux tissus tumoraux ; Régression de la tumeur.

Suite à son administration systémique ou topique, les molécules de photosensibilisateurs s'accumulent donc préférentiellement dans les tumeurs où elles seront activées par de la lumière visible. Lorsque la tumeur est illuminée, les PS sont amenés jusqu'à un état électronique excité triplet et peuvent ensuite réagir via un mécanisme de type I ou de type II (FOOTE, 1991). Le mécanisme de type I implique l'interaction des PS avec des molécules substrats via l'arrachement de protons ou transfert d'électrons pour donner des radicaux et des espèces ioniques qui peuvent à leur tour réagir avec l'oxygène moléculaire pour donner des espèces réactives d'oxygène cytotoxiques (ROS). Dans le mécanisme de type II (Figure 2), les PS excités au niveau triplet peuvent réagir en transférant leur énergie à l'oxygène moléculaire triplet (O_2) qui deviendra de l'oxygène moléculaire singulet (1O_2) pouvant ensuite réagir avec un grand nombre de substrats biologiques en leur causant des dommages oxydatifs (SHARMAN et al., 2000). Les produits très réactifs dérivés de l'oxygène produisent les premiers dommages aux sites où les PS se situent, étant donné leur très courte

demi-vie dans un environnement biologique. Bien que les deux mécanismes reposent sur la présence d'oxygène, le mécanisme de type II est celui le plus accepté pour mener jusqu'à la mort cellulaire (SHARMAN et al., 2000; WEISHAUPT et al., 1976).

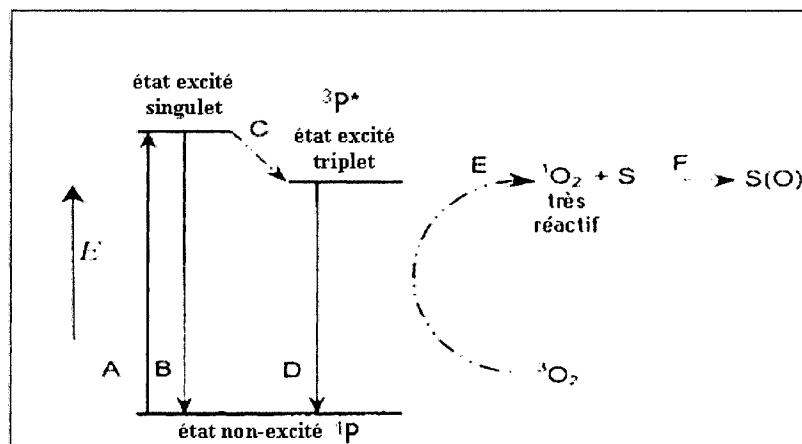


Figure 2 - Diagramme de Jablonski: de l'excitation d'un photosensibilisateur jusqu'à l'oxydation d'un substrat biologique

(A) Excitation du photosensibilisateur par l'énergie lumineuse appropriée (B) Relaxation par fluorescence (C) Passage de l'état excité singulet à triplet (D) Relaxation par phosphorescence (E) Transfert de l'énergie et passage de l'oxygène moléculaire à l'oxygène singulet très réactif (F) Oxydation d'un substrat biologique par l'oxygène singulet.

Image modifiée de MacDonald et al., 2001.

1.2 - Agents photosensibilisateurs et applications de la thérapie photodynamique

Les agents photosensibilisateurs sont donc des composés capables d'absorber de la lumière à une longueur d'onde spécifique et de la transformer en énergie utilisable. Dans le cas de la thérapie photodynamique, cela engendre la production d'agents cytotoxiques qui s'attaquent à des substrats biologiques (SHARMAN et al., 1999). En 1904 le terme « action photodynamique » a tout d'abord été introduit par Tappeiner pour décrire l'effet destructif causé par la lumière sur des organismes vivants suite à l'administration de certains colorants

ou photosensibilisateurs (VON TAPPEINER et JODLBAUER, 1904). L'utilisation de l'hématoporphyrine comme photosensibilisateur est arrivée peu de temps après que Hausmann ait décrit son effet en détail sur des cellules et des animaux entre 1908 et 1911 (HAUSMANN, 1911). En 1942, l'aspect thérapeutique a vu le jour lorsque Auler et Banzer ont rapporté que des tumeurs exposées aux rayons UV émettaient de la fluorescence et devenaient nécrosées lorsque des porphyrines avaient été administrées, montrant que certaines porphyrines étaient retenues par les tissus néoplasiques avec une certaine préférence par rapport aux tissus normaux (AULER et BANZER, 1942). De plus, Diamond et al. ont montré en 1972 que l'irradiation prolongée de tumeurs, chez un sujet ayant reçu de l'hématoporphyrine, engendrait leur destruction (DIAMOND et al., 1972). En 1976, Kelly et Snell ont utilisé pour la première fois le HpD, un dérivé d'hématoporphyrine, comme photosensibilisateur pour la thérapie photodynamique du cancer de la vessie chez des humains (KELLY et SNELL, 1976). Une version plus pure du HpD, la Photofrin[®], initialement mise en marché par QLT PhotoTherapeutics est maintenant utilisée en clinique dans plusieurs pays pour traiter différents cancers comme par exemple ceux du poumon, de l'œsophage, de la vessie, de l'estomac et du cou (QLT INC.; SHARMAN et al., 1999). Il s'agit d'un photosensibilisateur à action indirecte, c'est-à-dire qui tue les cellules tumorales en affectant les vaisseaux sanguins les irriguant. Par contre, la Photofrin[®] est un mélange complexe et variable duquel il a été impossible d'isoler une composante unique ayant une grande activité biologique, rendant la synthèse chimique et l'activité biologique difficiles à reproduire (VALLÉS, 1993; WOHRLE et al., 1998). De plus, ce photosensibilisateur procure une rétention cutanée prolongée et entraîne une importante sensibilité de la peau à la lumière (WOHRLE et al., 1998).

Malgré ces désavantages, les PS de première génération tels que la Photofrin[®] sont devenus un bon outil dans la lutte contre le cancer mais plusieurs groupes ont poursuivi leurs recherches afin de développer d'autres PS plus purs avec de meilleures propriétés de localisation tumorale et d'absorption de lumière, une bonne stabilité chimique ainsi qu'un degré de toxicité minimal à la noirceur, les rendant davantage intéressants pour une utilisation clinique en thérapie photodynamique du cancer. En effet, en plus d'être plus stables et plus purs, les PS de seconde génération ont une meilleure sélectivité pour les tumeurs, sont rapidement excrétés de l'organisme et possèdent de meilleures propriétés optiques, c'est-à-dire une absorption lumineuse plus grande et à une longueur d'onde plus élevée, permettant de donner une plus faible dose de lumière et d'avoir une meilleure pénétration dans le tissu (BONNETT, 1995; WOHRLE et al., 1998). On y retrouve différentes classes de photosensibilisateurs dont les dérivés de porphyrines et de chlorines, les purpurines, les benzoporphyrines, les phtalocyanines et les naphthalocyanines (FISHER et al., 1995).

Les molécules de phtalocyanines ont longtemps été utilisées comme agents colorants dans l'industrie et ont même été employés en tant qu'agents photoconducteurs dans les photocopieurs (SHARMAN et al., 1999). Au niveau médical, les phtalocyanines ont largement été étudiées due à leur forte absorption dans la région rouge du spectre ($\lambda = 680$ nm) où la transparence des tissus est optimale (ALI et VAN LIER, 1999). De plus, la sensibilité de la peau du sujet au soleil est négligeable puisque les phtalocyanines absorbent très peu à des longueurs d'onde entre 400-600 nm comparativement aux porphyrines (MOSA et al., 1997). Afin d'augmenter leur activité photodynamique, un ion métallique

diamagnétique comme le Zn^{2+} ou l' Al^{3+} est souvent incorporé au centre de la molécule de phtalocyanine, ce qui augmente la durée du photosensibilisateur à l'état triplet ainsi que leur rendement (VAN LIER et SPIKES, 1989). Leur synthèse chimique et leur structure permettent donc l'addition d'un ion métallique au centre, mais aussi de substituants en périphérie de leur macrocycle hydrophobe, souvent des groupes sulfure (ALLEN et al., 2001). Ainsi, les photosensibilisateurs de la classe des phtalocyanines sont classés en trois groupes majeurs d'après leur degré d'hydrophobicité (BOYLE et DOLPHIN, 1996). Les PS hydrophobes sont ceux ne portant aucun substituant périphérique chargé, les PS hydrophiles possèdent un minimum de 3 substituants chargés et les PS amphiphiles en portent 2 ou moins. Des facteurs comme la structure, la charge et le degré d'hydrophobicité du photosensibilisateur déterminent ses interactions avec lui-même et les composantes biologiques qui l'entourent, comme les diverses protéines de transport sériques, ce qui détermine donc sa localisation tumorale et son efficacité thérapeutique (MACDONALD et DOUGHERTY, 2001).

La thérapie photodynamique a subi une évolution très rapide depuis 1997 tant au niveau de ses applications cliniques qu'en recherche. En effet, elle a été approuvée par la « U.S. Food and Drug Administration » (FDA) ainsi que par plusieurs autres agences de santé à travers le monde et est maintenant considérée comme le traitement standard dans plusieurs cas cliniques (DETTY et al., 2004; SHARMAN et al., 1999). Dans le domaine de l'oncologie, la TPD sert à traiter plusieurs cas de cancers dont ceux de la peau, du tractus aéro-digestif, du sein, de la vessie, de la tête et du cou. D'autres conditions non-malignes comme le psoriasis, les taches de vin, la dégénérescence maculaire liée à l'âge et la resténose, c'est-à-dire le

rétrécissement répétitif d'une artère après une chirurgie correctrice peuvent aussi être traitées à l'aide de la TPD (DOUGHERTY et al., 1998; DOUGHERTY, 2002; MOAN et PENG, 2003). La thérapie photodynamique est donc une modalité de traitement prometteuse acceptée en clinique au niveau curatif ou palliatif en oncologie, mais elle est aussi employée en dermatologie, en ophtalmologie et en cardiologie pour soigner d'autres conditions non-malignes, ainsi que pour la stérilisation du plasma sanguin (Tableau 1). Il est à noter que la thérapie photodynamique est aussi utilisée en médecine vétérinaire dans le traitement de divers cancers chez les chiens et les chats (CHELI et al., 1987; PEASTON et al., 1993).

Tableau 1 - Liste de quelques photosensibilisateurs utilisés en clinique

Informations provenant de: Brown et al., 2004; Moan et al., 2003; Sharman et al., 1999.

CLASSES	PHOTOSENSIBILISATEURS	APPLICATIONS CLINIQUES
Porphyrines	Dérivé d'hématoporphyrine (Photofrin [®])	Cancers de l'œsophage, du poumon, de l'estomac et de la vessie
	Dérivé d'hématoporphyrine (Photoheme)	Cancers de la peau, du sein, du tractus aéro-digestif et Psoriasis
	Acide aminolevulinique ou ALA (Levulan [®])	Kératose actinique et Cancers de la peau
Phtalocyanines	AlPcS (Photosense)	Cancers de l'œsophage, du poumon, de l'estomac, de la peau et du sein
Chlorines	Temoporfin (Foscan [®])	Cancers du cou et de la tête
	Verteporfin (Visudyne [™])	Dégénérescence maculaire
Thiazines	Bleu de méthylène	Stérilisation du plasma sanguin

1.3 - Mécanismes d'action de la TPD

Les résultats de plusieurs études sur la thérapie photodynamique du cancer chez des rongeurs ont montré l'existence de différents types de mécanismes d'action pouvant mener à la régression des tumeurs (PENG et al., 1990; ZHOU, 1989). Lorsque la TPD endommage la membrane des cellules tumorales ou celle de leurs organelles, via l'oxydation de leurs composantes lipidiques et protéiques, il s'ensuit une altération de la perméabilité et de la fluidité membranaires, ainsi qu'une inactivation du fonctionnement des enzymes et des récepteurs associés à ces membranes. Ce type de mécanisme d'action est donc qualifié de direct, puisque la mort des cellules tumorales a lieu suite à des dommages faits à même les constituants cellulaires, comme la membrane plasmique, les lysosomes et les mitochondries (DOUGHERTY et al., 1998; GIROTTI, 1990; ZHOU, 1989).

Lorsque la TPD endommage plutôt l'endothélium vasculaire de la tumeur, c'est-à-dire les cellules endothéliales bordant les vaisseaux sanguins tumoraux, il s'ensuit une production de composés vasoactifs divers tels que des eïcosanoïdes comme le tromboxane, des cytokines et de l'histamine et des facteurs de coagulation. Ceci engendre une augmentation de la perméabilité vasculaire aux macromolécules, la constriction des vaisseaux, l'agrégation de plaquettes et éventuellement une stase vasculaire (BEN-HUR et al., 1988; FINGAR, 1996). Étant donné que la présence d'un flot sanguin tumoral adéquat est nécessaire pour approvisionner les cellules en nutriments et en oxygène, s'il est altéré suite à un traitement comme la TPD par exemple, les cellules tumorales affectées peuvent manquer de nutriments, souffrir d'hypoxie et finalement mourir (HENDERSON et FINGAR, 1987). Ce type de mécanisme d'action est donc qualifié d'indirect, puisque la mort des cellules

tumorales a lieu suite à des dommages faits aux vaisseaux sanguins les irriguant (OLEINICK et EVANS, 1998; ZHOU, 1989). En plus, une réponse inflammatoire a aussi souvent lieu au niveau de la tumeur traitée et des tissus environnants, contribuant aussi à la mort des cellules tumorales suite à la TPD (KORBELIK et KROSL, 1994; KROSL et al., 1995; YAMAMOTO et al., 1992).

La façon dont se déroulera la réponse tumorale au traitement dépend quant à elle de la distribution relative des molécules de photosensibilisateurs dans les compartiments cellulaires et vasculaires au moment de l'illumination, qui elle dépend de la nature chimique du photosensibilisateur utilisé et de la façon dont il est acheminé dans l'organisme (ALI et al., 1988; BOYLE et al., 1992; BRASSEUR et al., 1996; KESSEL et al., 1987; KRAMMER, 2001). Ceux de nature amphiphile, comme la drogue disulfonée ZnPcS_2 , sont préférentiellement transportés par des lipoprotéines qui pénètrent directement dans les cellules tumorales via des récepteurs à LDL (JORI et REDDI, 1993; JORI, 1989; MAZIERE et al., 1991; PENG et MOAN, 1995; PENG et al., 1990). Les photosensibilisateurs hydrophiles comme la drogue tétrasulfonée AlPcS_4 sont plutôt transportés par la protéine sérique albumine et il en résulte une accumulation dans les espaces interstitiels et le stroma vasculaire de la tumeur (JORI, 1989; KESSEL et al., 1987; KONGSHAUG, 1992; PENG et MOAN, 1995; PENG et al., 1990; PENG et al., 1991).

La localisation des molécules de photosensibilisateurs a donc une énorme implication au niveau du mécanisme par lequel la thérapie photodynamique engendrera la régression tumorale. Par conséquent la TPD faite avec des photosensibilisateurs amphiphiles, comme le

ZnPcS_2 , endommage plusieurs constituants cellulaires et engendre donc la mort directe des cellules tumorales. Alors que la TPD faite avec des photosensibilisateurs hydrophiles, comme le AlPcS_4 , endommage les vaisseaux sanguins tumoraux, interrompant l'apport en oxygène et nutriments, ce qui résulte aussi à la mort des cellules mais de façon indirecte (CHAN et al., 1996; CHAN et al., 1997; HENDERSON et al., 1985; MILANESI et al., 1990; PENG et al., 1990; ROSENTHAL, 1991; VAN LIER et SPIKES, 1989).

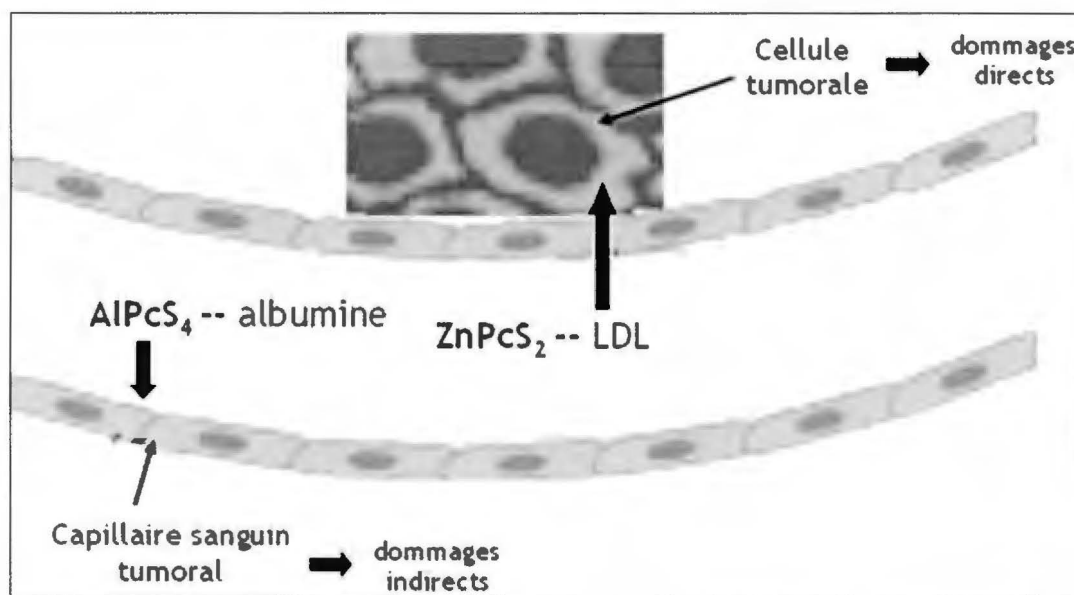


Figure 3 - Transport, distribution et mécanisme d'action des photosensibilisateurs ZnPcS_2 et AlPcS_4 au niveau du tissu tumoral

2 - Tomographie d'émission par positrons (TEP)

2.1 - Principe général de la TEP

La tomographie d'émission par positrons (TEP) est une technologie d'imagerie moléculaire qui utilise des molécules radiomarquées pour produire des images de leurs interactions au niveau de divers processus biologiques se déroulant dans un organisme, tout comme les sciences pharmaceutiques utilisent des molécules pour qu'elles agissent de façon thérapeutique au niveau de divers processus biologiques (PHELPS, 2000). Cette technologie d'imagerie médicale nécessite d'abord la production de radioisotopes émetteurs de positrons (β^+) à l'aide d'un cyclotron, par bombardement de cibles spécifiques d'éléments stables à l'aide de protons ou de deutons accélérés à des énergies de plusieurs MeV. À chaque désintégration β^+ , le positron émis du noyau parcourt une courte distance avant de subir une annihilation avec un électron présent dans le tissu. L'annihilation de ces deux particules résulte en l'émission simultanée de deux photons à 180° . Ces photons possèdent une énergie de 511 keV, indépendamment du radionucléide utilisé, rendant impossible une étude avec deux radionucléides différents en même temps (CHERRY et GAMBHIR, 2001). Il y a ensuite détection simultanée des photons d'annihilation par des détecteurs opposés situés sur un anneau du tomographe (Figure 4). L'acquisition d'un grand nombre de ces événements permet, avec des techniques de reconstruction tomographique, de reconstituer la distribution de la source d'activité à l'intérieur du sujet sous étude, générant les images TEP (LECOMTE et al., 2002).

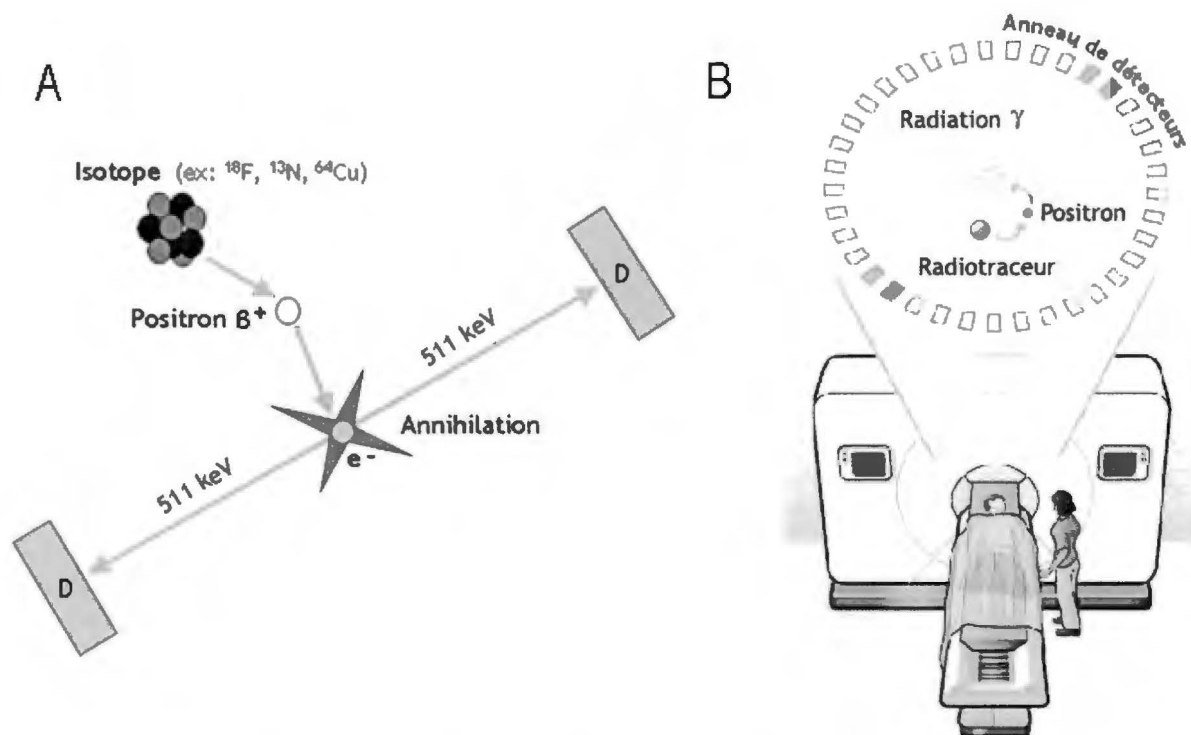


Figure 4 - Principe de la tomographie d'émission par positrons

(A) L'annihilation d'un positron émis par le radioisotope avec un électron (e^-) dans le tissu engendre l'émission de deux photons diamétralement opposés. Détection simultanée de ces photons par les détecteurs (D) de la caméra, ce qui résulte en une ligne de coïncidence. L'image générée est le résultat de plusieurs lignes de coïncidence cumulées
(B) Scanner TEP clinique montrant un anneau de détecteurs.

(A) Image modifiée de Lecomte et al., 2002.

(B) Image modifiée de <http://www.scq.ubc.ca/?p=474>

Les principaux radionucléides émetteurs de positrons d'intérêt en recherche et en médecine nucléaire sont le fluor-18 ($t_{1/2} = 109,8$ min), l'azote-13 ($t_{1/2} = 10$ min), l'oxygène-15 ($t_{1/2} = 2,03$ min), le carbone-11 ($t_{1/2} = 20,4$ min), l'iode-124 ($t_{1/2} = 4,17$ j), le cuivre-62 ($t_{1/2} = 9,74$ min) et le cuivre-64 ($t_{1/2} = 12,7$ h) (CHERRY et GAMBHIR, 2001). Une des limitations de la TEP est reliée à la courte demi-vie de quelques-uns de ces radionucléides, amenant des restrictions dans le temps disponible pour faire la synthèse radiochimique, car les radioisotopes

émetteurs de positrons sont rarement utilisés dans leur état natif pour l'imagerie, mais sont plutôt introduits dans des molécules comme marqueur radioactif permettant de suivre le cheminement du produit radiopharmaceutique à l'intérieur de l'organisme. La présence d'un cyclotron sur le site même des études pré-cliniques ou cliniques est donc préférable (ABOAGYE et PRICE, 2003; LECOMTE et al., 2002). Le Tableau 2 illustre plusieurs radiotraceurs et leurs applications au niveau de la TEP en oncologie comme l'évaluation du métabolisme du glucose, de la prolifération cellulaire et de la perfusion sanguine.

Tableau 2 - Radiotraceurs utilisés lors d'études oncologiques à l'aide de la TEP

Tableau modifié de Lecomte et al., 2002.

RADIOTRACEURS	APPLICATIONS
[¹⁸ F]-Fluorodésoxyglucose (FDG)	Métabolisme du glucose
[¹⁸ F]-Fluorothymidine (FLT)	Synthèse d'ADN / Prolifération cellulaire
[¹⁸ F]-Fluorure	Remodelage osseux dû à la présence de métastases
[¹³ N]-NH ₃ , [¹⁵ O]-H ₂ O et [^{62,64} Cu]-PTSM	Perfusion sanguine
[¹⁸ F]-Fluoromisonidazole (FMISO)	Hypoxie
[¹⁸ F]-Fluoroestradiol (FES)	Cancers du sein / Liaison aux récepteurs

2.2 - Applications de l'imagerie TEP

La tomographie d'émission par positrons possède de nombreuses applications en recherche aussi bien qu'en clinique. Il s'agit d'une technique d'imagerie nucléaire fonctionnelle permettant de déterminer de façon non-invasive la distribution spatiale et temporelle de

diverses molécules marquées avec un radioisotope émetteur de positrons. En obtenant des images tomographiques séquentiellement dans le temps à l'aide de la TEP, il est possible de recueillir des informations *in vivo* sur l'évolution de divers processus physiologiques et biochimiques au niveau moléculaire (TATSUMI et al., 2003). Des modèles mathématiques peuvent ensuite être appliqués à ces séries d'images temporelles pour décrire la cinétique des radiotraceurs et extraire des paramètres d'intérêt biologique tels que la consommation de glucose ou d'oxygène, la perfusion sanguine et le taux d'occupation de récepteurs spécifiques (LECOMTE et al., 2002). L'imagerie TEP dispose donc d'un grand nombre d'applications possibles dans les secteurs de la neurologie, la cardiologie et l'oncologie (HERSCHMAN, 2003; MYERS, 2001). De plus, l'imagerie TEP rejoint aussi le domaine de la biologie moléculaire en permettant l'étude de l'expression de divers gènes (IYER et al., 2001; WU et al., 2002) ainsi que l'étude de la distribution d'antigènes en utilisant des anticorps radiomarqués (SUNDARESAN et al., 2003). Cette modalité d'imagerie fonctionnelle comporte par contre une faiblesse au niveau anatomique. La corrélation anatomique des régions de captation s'avère difficile sur les images TEP, surtout lors d'études moléculaires. Afin de fournir des repères anatomiques pour faciliter l'interprétation des images, l'imagerie TEP peut être combinée avec une technique d'imagerie anatomique non-invasive, telle que la tomodensitométrie (TDM) (TOWNSEND et al., 1998) ou l'imagerie par résonance magnétique (IRM) (SLATES et al., 1999) générant ainsi des images anato-moléculaires. Heureusement ces technologies sont maintenant aussi adaptées pour l'imagerie de petits animaux de laboratoire (WEISSLEDER et MAHMOOD, 2001).

L'imagerie TEP en oncologie avec le radiotracer [^{18}F]-FDG mesurant le métabolisme du glucose est très utilisée afin d'évaluer de façon précoce l'existence ou non d'un effet antitumoral lors de l'application de divers traitements au niveau pré-clinique et clinique (CHAIKEN et al., 1993; RIGO et al., 1996). Son utilité dans l'évaluation de la réponse tumorale suite à la thérapie photodynamique a entre autres été démontrée (LAPOINTE et al., 1999; MOORE et al., 1998). En effet, l'emploi de l'imagerie TEP animale lors d'études pré-cliniques sur la thérapie photodynamique du cancer s'est avéré concluant et cela devrait encourager les cliniciens utilisant la TPD à instaurer l'imagerie TEP au [^{18}F]-FDG pour prédire la réponse tumorale chez leurs patients tôt suite au traitement (MOORE et al., 1997).

L'observation de changements morphologiques au niveau de la grosseur et de la composition des tumeurs, sans l'utilisation de l'imagerie nucléaire, était auparavant la façon standard employée pour évaluer l'efficacité d'un traitement lors d'études pré-cliniques. Cependant, ces changements surviennent souvent après un certain temps et il est donc difficile d'évaluer une réponse tôt suite au traitement (SUGIYAMA et al., 2004). La TEP en oncologie est donc très avantageuse car la physiologie et le métabolisme tumoral changent beaucoup plus rapidement en réponse aux traitements que la morphologie de la lésion elle-même. Ainsi, la TEP permet d'établir beaucoup plus rapidement le succès ou l'échec d'une intervention donnée (LECOMTE et al., 2002; WEBER et al., 2000). En effet, plusieurs groupes ont remarqué que la diminution de la captation en [^{18}F]-FDG était plus prononcée que la réduction de la taille des tumeurs peu de temps suite à des séances de radiothérapie ou de chimiothérapie chez des souris (ABE et al., 1986; YOSHIOKA et al., 1997). D'autres études sont en accord sur le fait que l'information obtenue est incomplète avec seulement

des mesures standards de la morphologie des tumeurs car les résultats complémentaires obtenus avec l'imagerie TEP permettent de suivre plus adéquatement la réponse thérapeutique pour ainsi déterminer l'efficacité globale du traitement ou ses mécanismes d'action (LEWIS et al., 2001; MARGARON et al., 1996). L'idéal est de combiner des techniques d'imagerie métabolique et anatomique, telle que la technologie TEP/TDM, ce qui permettrait assurément d'améliorer le suivi thérapeutique en reliant la viabilité tumorale à la masse totale de la tumeur (WEBER et al., 2000). De plus, l'utilisation de techniques d'imagerie permet d'effectuer des mesures répétées chez le même animal, facilitant ainsi le suivi d'une intervention thérapeutique et permettant à chaque animal de servir comme son propre contrôle.

Lorsqu'il s'agit d'études *ex vivo*, les mesures ne peuvent être réalisées qu'à des temps sélectionnés, rendant très exhaustives et variables les études voulant observer des changements physiologiques et suivre le cours d'une réponse thérapeutique. De plus lorsque des prélèvements sont effectués, ils sont souvent faits au hasard ou bien sur des régions spécifiques choisies sur la lésion ou le tissu en entier, alors que l'imagerie *in vivo* nous donne de l'information sur la physiologie et la pathologie au niveau microenvironnemental même de la totalité de la région désirée (CECKLER et al., 1991). En effet, avec les techniques *in vitro* de culture cellulaire et d'hybridation *in situ*, plusieurs désordres biologiques sont étudiés avec des molécules radiomarquées. Cependant, ces systèmes d'études sont grandement simplifiés, alors que la TEP peut suivre ces mêmes molécules dans l'organisme tout entier, incluant les effets de transport, de métabolisme, d'excrétion et d'interactions entre les organes, ces facteurs étant souvent déterminants dans l'évaluation de

l'efficacité d'un nouveau traitement (CHERRY et GAMBHIR, 2001). En effet, plusieurs compagnies pharmaceutiques utilisent maintenant l'imagerie TEP moléculaire dans le cadre de leur recherche de nouveaux médicaments ainsi que dans le criblage *in vivo* afin de déterminer le meilleur médicament parmi quelques médicaments potentiels (CHATZIOANNOU, 2002).

Aussi, lorsque de nouveaux radiotraceurs émetteurs de positrons sont synthétisés, leur biodistribution dans le temps doit être étudiée chez des modèles animaux vivants. Les biodistributions traditionnelles se font par dissection, donc on ne peut évidemment pas reprendre le même animal pour chaque temps d'étude. Tandis qu'avec l'imagerie TEP, il est possible de répéter les mesures sur le même animal afin de connaître la biodistribution spatiale et temporelle des radiotraceurs étudiés et la variabilité causée par les différences entre les sujets n'existe plus.

2.3 - Mesure du métabolisme tumoral

Tant au niveau de l'imagerie TEP cardiaque, oncologique que cérébrale, le 2-deoxy-2- ^{18}F -fluoro-D-glucose (^{18}F -FDG), un analogue du glucose, est un radiotraceur très utilisé en clinique et il est aussi le plus couramment employé dans le cadre des études pré-cliniques chez les animaux. Sa captation par divers tissus reflète leur niveau de métabolisme du glucose et ce dernier se trouve altéré dans de vastes cas de désordres biologiques et de maladies, comme les cas de cancers. De plus lors des études d'imagerie, la quantité de ^{18}F -FDG injectée est de beaucoup inférieure à celle nécessaire pour produire des effets pharmacologiques (PHELPS, 2000).

Dès les années 1930, Warburg a observé l'augmentation du métabolisme du glucose dans des tumeurs malignes (WARBURG, 1956). En effet, la captation tumorale du glucose et de son analogue [^{18}F]-FDG est favorisée entre autres par l'augmentation du nombre de molécules de transport du glucose, appelées GLUT, à la surface des cellules tumorales (SMITH, 1998). Ensuite, l'enzyme hexokinase leur ajoute un groupement phosphate afin qu'ils puissent entrer dans le processus de la glycolyse. Alors que le métabolisme du glucose-6-phosphate se poursuit sous l'action d'autres enzymes jusqu'à éventuellement créer de l'énergie, de l'eau et du CO_2 , le [^{18}F]-FDG-6-phosphate n'est pas un substrat pour les réactions subséquentes du cycle glycolytique et demeure essentiellement piégé à l'intérieur de la cellule sans subir de dégradation immédiate significative (LECOMTE et al., 2002; WEBER, 1968) (Figure 5).

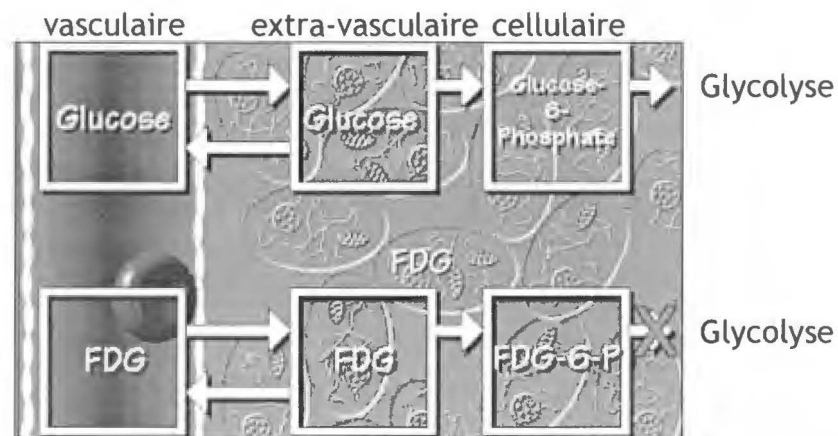


Figure 5 - Représentation schématique du transport et du métabolisme du [^{18}F]-FDG dans les tissus

Le glucose et le [^{18}F]-FDG sont transportés à travers les capillaires et la membrane cellulaire et sont phosphorylés par l'enzyme hexokinase. Seul le glucose-6-P entre dans le cycle glycolytique pour y être métabolisé, alors que le [^{18}F]-FDG demeure piégé dans la cellule.

Image modifiée de
www.crump.ucla.edu/software/lpp/tracerm modeling/lggifs/fdgmoddetail.html

Il en résulte une accumulation du radiotracer [^{18}F]-FDG qui constitue un reflet fidèle du taux d'utilisation du glucose et qui peut être utilisé comme indice de survie des cellules tumorales après l'application d'un traitement (LECOMTE et al., 2002). De plus, la consommation accrue de glucose et de [^{18}F]-FDG par les tumeurs, comparée à celle des tissus sains environnants, combinée à l'élimination rapide du [^{18}F]-FDG par la plupart des autres tissus et organes engendre des images TEP de haut contraste illustrant l'activité métabolique tumorale (Figure 6). Ceci est primordial dans la détection des tumeurs cancéreuses ainsi que dans leur suivi aux traitements (CHAIKEN et al., 1993). De plus, les sujets à l'étude doivent préférablement être à jeûn car des études *in vitro* et *in vivo* ont démontré une relation inverse entre le niveau de glucose extracellulaire et la captation de [^{18}F]-FDG dans les cellules tumorales (WAHL et al., 1992).



Figure 6 - Distribution normale du [^{18}F]-FDG chez un rat portant des tumeurs sous les pattes avant

Ce sucre radioactif est capté par plusieurs organes et tissus tels que le cerveau, le cœur, le tractus gastrointestinal et les tumeurs.

Cependant même si le [^{18}F]-FDG procure des informations très utiles au niveau des tumeurs, certaines études cliniques et pré-cliniques ont nécessité ou nécessiteront le développement de radiotraceurs alternatifs plus spécifiques relevant des processus cellulaires précis comme la prolifération cellulaire, l'hypoxie et l'apoptose (BLANKENBERG, 2004; CARNOCHAN et BROOKS, 1999; GRONROOS et al., 2004).

2.4 - Mesure d'autres paramètres tumoraux

2.4.1 - Flot sanguin

La tomographie d'émission par positrons est aussi souvent utilisée dans l'évaluation de la perfusion sanguine myocardique, afin d'évaluer la viabilité du myocarde suite à un infarctus ou une transplantation cardiaque par exemple (HOVE et al., 2003). La TEP est aussi très utile au niveau d'études cérébrales variées sur des patients schizophréniques, amnésiques ou ayant subi un accident cérébro-vasculaire par exemple (EUSTACHE et al., 1997; SAHA et al., 1994; WEBER et al., 2004). Habituellement, l'étude du flot sanguin chez ces tissus se fait à l'aide de radiotraceurs comme l'ammoniac ($[^{13}\text{N}]\text{-NH}_3$) ou l'eau ($[^{15}\text{O}]\text{-H}_2\text{O}$) radiomarqués. En oncologie, en complément des études métaboliques, des mesures TEP du flot sanguin tumoral seraient aussi très pertinentes dans l'évaluation de la pathophysiologie des tumeurs, ainsi que dans la planification et le suivi des interventions thérapeutiques (HAWKINS et PHELPS, 1988; XIANGSONG et al., 2006). En effet, la caractérisation de la perfusion tumorale préalablement au traitement peut représenter pour les cliniciens un outil rationnel au niveau du choix et de la planification de la thérapie, en plus de fournir un indice pronostique important (LECOMTE et al., 2002).

Le pyruvaldéhyde-bis(N4-méthylthiosemicarbazone), ou PTSM, est une autre molécule prometteuse dans l'évaluation de la perfusion de divers tissus avec la TEP. Elle peut être marquée avec un des radioisotopes du cuivre ($[Cu]$ -PTSM) ayant des temps de demi-vie variant de 9,7 minutes à 2,6 jours. Le $[Cu]$ -PTSM est une molécule lipophile non-chargée démontrant une haute extraction tissulaire au premier passage au niveau des organes bien perfusés. De plus, il y a emprisonnement tissulaire prolongé du cuivre radioactif (Figure 7) assurant une bonne corrélation entre la concentration régionale du radiotraceur et le taux de perfusion sanguine de cette région (GREEN et al., 1990; JOHN et GREEN, 1990; SHELTON et al., 1990).

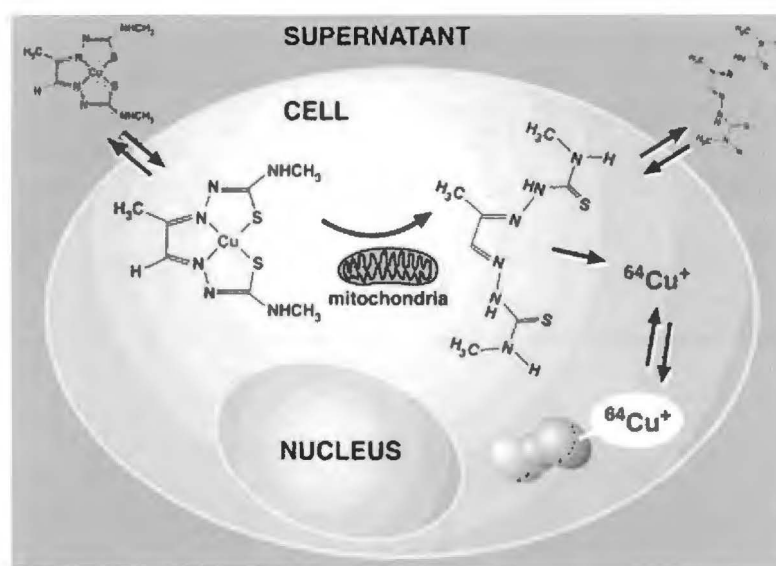


Figure 7 - Captation cellulaire du $[^{64}Cu]$ -PTSM

La molécule de $[Cu]$ -PTSM diffuse à travers la membrane cellulaire et libère ensuite l'atome de cuivre dans la cellule. Des macromolécules intracellulaires captent l'atome de cuivre réduit tandis que la molécule de PTSM quitte la cellule.

Image provenant de Adonai et al., 2002.

Des images de flot sanguin de haute qualité ont été obtenues avec le [^{64}Cu]-PTSM chez des cerveaux de primates (MATHIAS et al., 1990) ainsi que chez des cœurs (SHELTON et al., 1989) et des reins (SHELTON et al., 1990) de chiens. Le PTSM marqué au ^{62}Cu s'est aussi révélé prometteur en tant que radiopharmaceutique clinique basé sur un générateur dans l'évaluation de la perfusion cérébrale et myocardique (BEANLANDS et al., 1992; GREEN et al., 1990; WALLHAUS et al., 1998) (Figure 8). De plus, le [^{62}Cu]-PTSM a déjà été employé en clinique dans la détection de maladies coronariennes (WALLHAUS et al., 2001).



Figure 8 - Image TEP de la distribution du [^{62}Cu]-PTSM chez un patient sain

Importante captation du radiotracer au niveau d'organes bien perfusés comme le cerveau, le cœur et le foie.

Image provenant de Wallhaus et al., 1998.

Alors même si le [Cu]-PTSM s'avère être un traceur du flot sanguin convenant à l'imagerie d'organes bien perfusés tels que le cerveau, le cœur, les reins et le foie et ce, tant au niveau

de la recherche que de la clinique, des études sur des rongeurs portant des tumeurs ont suggéré que le [Cu]-PTSM pourrait aussi servir de traceur de la perfusion sanguine tumorale (BABICH et al., 1989; MATHIAS et al., 1991). En effet, les études menées par l'équipe de Mathias et al. montrent par biodistribution l'existence d'une corrélation entre les niveaux de [^{64}Cu]-PTSM et de [^{125}I]-iodoantipyrine ([^{125}I]-IAP) retrouvés dans le cerveau et les tumeurs colorectales de hamsters, ce dernier traceur étant connu pour mesurer le flot sanguin tumoral. Ils ont aussi comparé le niveau de captation du [^{64}Cu]-PTSM chez deux modèles de tumeurs différents, soient des implants de carcinomes colorectaux chez des hamsters et des tumeurs de la prostate chez des rats. Dans les deux cas, les tumeurs étaient clairement visibles sur les images et la radioactivité retenue dans les tumeurs était constante durant l'imagerie de 30 minutes. Ils ont ensuite mesuré la perfusion tumorale avec le [^{67}Cu]-PTSM chez des chiens (MATHIAS et al., 1994) et ont montré l'existence d'une corrélation linéaire avec l'emploi de microsphères radiomarquées, ces dernières représentant le standard par excellence pour confirmer des mesures de flot sanguin. Alors considérant ces résultats pré-cliniques et une étude évaluant le [^{62}Cu]-PTSM en tant qu'agent mesurant le flot sanguin tumoral chez l'humain (WAHL et al., 1993), le [Cu]-PTSM s'avère être un radiopharmaceutique prometteur dans l'étude de la perfusion sanguine tumorale à l'aide de la TEP.

2.4.2 - Prolifération cellulaire

Mesurer la prolifération des cellules tumorales dans le but de suivre la réponse à divers traitements contre le cancer est maintenant rendue possible avec l'imagerie TEP (PIO et al., 2006). En effet, le [^{18}F]deoxy-fluorothymidine ([^{18}F]-FLT) est un nouveau traceur

permettant d'étudier la réplication de l'ADN et la multiplication cellulaire (BARTHEL et al., 2003; SUGIYAMA et al., 2004). La thymidine étant un des constituants du matériel génétique, l'imagerie de la synthèse de l'ADN lors de la réplication des cellules est donc rendue possible avec ce radiotraceur (Figure 9).

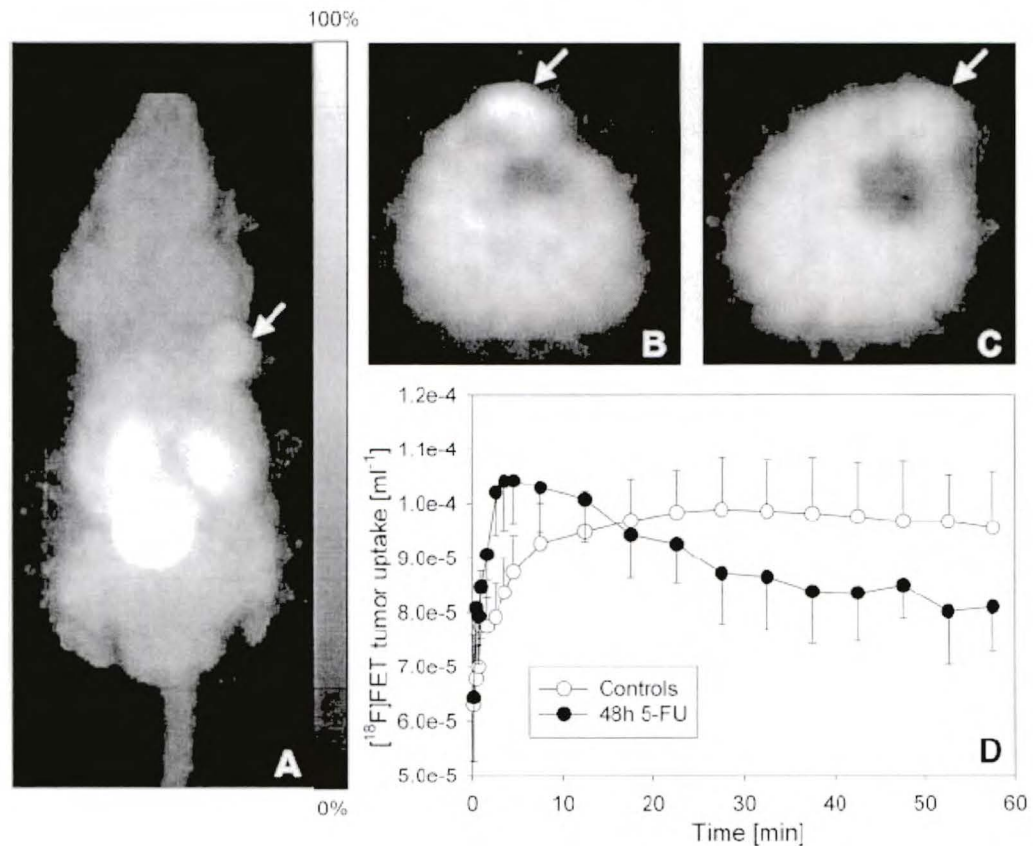


Figure 9 - Imagerie TEP de la prolifération cellulaire avec le $[^{18}\text{F}]$ -FLT

Images TEP au $[^{18}\text{F}]$ -FLT de souris portant des tumeurs RIF-1 réalisées 30-60 min post-injection (A) Image corps entier d'une souris traitée au 5-fluorouracil (5-FU) (B) Image transverse chez une souris contrôle (C) Image transverse chez une souris 48h post-traitement au 5-FU (D) Courbes temps-activité pour le groupe traité au 5-FU (●) et le groupe contrôle (○) (n = 3/groupe). Les flèches indiquent la position des tumeurs.

Image provenant de Barthel et al., 2003.

HYPOTHÈSE ET OBJECTIFS DE L'ÉTUDE

Étant donné que l'application de la thérapie photodynamique occasionne très rapidement des effets au niveau des tumeurs traitées, la tomographie d'émission par positrons pourrait certainement être un outil idéal pour étudier les réponses biochimiques et physiologiques au niveau des tumeurs tôt suite à ce traitement. En effet, au niveau d'études tumorales chez les rongeurs, l'imagerie TEP avec le [^{18}F]-FDG s'est avérée très utile dans la détermination de l'efficacité de la TPD et pourrait même être en mesure de fournir des informations importantes sur les mécanismes d'action de photosensibilisateurs variés (LAPOINTE et al., 1999; MOORE et al., 1998). À ce sujet, des essais préliminaires ont antérieurement été réalisés avec la TEP au [^{18}F]-FDG afin d'observer des changements dans le métabolisme tumoral tôt suite à la TPD, où un scan était réalisé 30 min et 2 h après l'illumination (LAPOINTE et al., 1999). L'obtention de profils de la captation tumorale du [^{18}F]-FDG a donné des indications sur les différents modes d'action des drogues utilisées en TPD, mais seulement deux scans post-illumination n'ont pas suffi à étudier de façon plus détaillée les mécanismes sous-jacents impliqués dans la mort cellulaire tumorale. En effet, étant donné que la cinétique de captation du [^{18}F]-FDG est relativement lente mais que les changements occasionnés par la TPD sont transitoires et assez rapides, une simple injection en bolus 30 min et 2 h après l'illumination n'a pas permis de mesurer instantanément le métabolisme du glucose dans les tumeurs et d'en détecter les changements transitoires durant et très tôt suite au traitement.

Alors dans le but d'observer les processus métaboliques transitoires se déroulant dans les tumeurs pendant et tout de suite après la thérapie photodynamique afin de comprendre plus en détail les différents modes d'action de ce traitement, nous avons mis au point une toute nouvelle procédure appelée « l'imagerie TEP en temps réel ». Cette procédure d'imagerie est réalisée chez le rat en infusant de façon lente et continue le radiotracer $[^{18}\text{F}]\text{-FDG}$, et pendant laquelle une des deux tumeurs est illuminée temporairement. Les changements dans la captation du $[^{18}\text{F}]\text{-FDG}$ observés en temps réel sont interprétés comme étant la réponse métabolique des cellules tumorales suite au traitement, nous aidant à discriminer si les photosensibilisateurs étudiés, soient le ZnPcS_2 et le AlPcS_4 , agissent de façon directe ou indirecte sur la mort des cellules tumorales.

Ensuite, un autre objectif du projet consistait à utiliser l'imagerie TEP en temps réel afin de vérifier l'implication possible du processus physiologique qu'est la stase vasculaire dans la baisse de captation du $[^{18}\text{F}]\text{-FDG}$ observée pendant la TPD avec un photosensibilisateur à action indirecte comme le AlPcS_4 . Pour ce faire, nous avons employé des traceurs de perfusion sanguine, tels que le $[^{13}\text{N}]\text{-NH}_3$ et le $[^{64}\text{Cu}]\text{-PTSM}$, afin de pouvoir déceler d'éventuelles variations dans le flot sanguin tumoral.

PRÉSENTATION DES TRAVAUX

Les études de métabolisme et de flot sanguin tumoral discutées dans le cadre de ce mémoire ont été effectuées avec le scanner TEP animal de Sherbrooke. Il possédait alors 512 détecteurs à base de photodiode avalanche, distribués en deux anneaux composés de cristaux BGO (germanate de bismuth) ou de LSO (oxyorthosilicate de lutétium), générant des images 2-D. Cette caméra possédait une résolution spatiale de 2,1 mm x 2,1 mm sur le plan transaxial et de 3,1 mm sur le plan axial, donc une résolution volumétrique de 14 μ l (LECOMTE et al., 1994).

1 - Article 1 : “Positron Emission Tomography Imaging of Tumor Response After Photodynamic Therapy”

La tomographie d'émission par positrons est une technique d'imagerie puissante et non invasive permettant d'étudier *in vivo* et au niveau moléculaire plusieurs processus physiologiques et biochimiques. Au niveau clinique, la TEP est surtout employée pour détecter des tumeurs cancéreuses et pour suivre leur réponse à divers traitements. Dans les milieux de recherche pré-clinique, la TEP à haute résolution pour les petits animaux est amenée à jouer un rôle important dans le développement de nouveaux médicaments et aussi dans l'optimisation de protocoles de traitement.

L'article qui suit présente en revue l'utilisation de la tomographie d'émission par positrons dans l'évaluation de la réponse tumorale à la thérapie photodynamique du cancer et discute du rôle potentiel de l'imagerie TEP dans le développement de nouveaux

photosensibilisateurs. Cette modalité d'imagerie moléculaire est notamment prometteuse dans l'évaluation en temps réel de la réponse tumorale à la TPD, tant au niveau de l'efficacité du traitement que de ses mécanismes d'action.

Voici la référence complète pour consulter la version finale et publiée de l'article 1 :

Positron Emission Tomography Imaging of Tumor Response After Photodynamic Therapy
V. Bérard, R. Lecomte and J.E. van Lier
J Environ Pathol Toxicol Oncol, Jan 2006; 25(1-2):239-50.

**POSITRON EMISSION TOMOGRAPHY IMAGING OF TUMOR RESPONSE
AFTER PHOTODYNAMIC THERAPY**

Véronique Bérard, Roger Lecomte and Johan E. van Lier

Department of Nuclear Medicine and Radiobiology
Faculty of Medicine, Université de Sherbrooke
Sherbrooke, QC, Canada J1H 5N4

Correspondence: J.E. van Lier, Department of Nuclear Medicine and Radiobiology, Faculty
of Medicine, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, QC, Canada, J1H 5N4;
johan.e.vanlier@usherbrooke.ca.

Positron emission tomography (PET) imaging is a powerful non-invasive tool allowing physiological and biochemical processes to be investigated *in vivo* at the molecular level. In the clinics, it is currently being used to detect and stage cancer and to assess tumor response following therapy. In cancer research at the pre-clinical level, PET in conjunction with a dedicated high-resolution small animal scanner can play an important role in drug development as well as in the evaluation of novel treatment protocols. In this paper, we review the use of PET in assessing tumor response to photodynamic therapy (PDT) and discuss its potential role in the development of novel photosensitizers. This molecular imaging modality is particularly promising for the real-time evaluation of tumor response to therapy both in terms of treatment efficacy and action mechanism.

Running head: PET imaging of PDT response

KEY WORDS: Photodynamic therapy, PET imaging, Real-time tumor response

INTRODUCTION

Photodynamic therapy (PDT) is a promising new treatment for light-accessible tumors.¹ This process combines tumor-localizing photosensitizers (PS), visible light and molecular oxygen to produce reactive oxygen species resulting in oxidative damage to the target tissue.² Depending on the localization of the PS, PDT may cause direct tumor cell kill or induce indirect damage to malignant cells by affecting the tumor vasculature. In addition to cell and/or vascular damage, PDT may produce an inflammatory response of the tumor and surrounding tissues.³

Small animal positron emission tomography (PET) is a powerful *in vivo* imaging modality to evaluate various processes in the neurosciences, molecular biology and oncology. Examples include studies of the metabolism and perfusion in the rat brain and heart after various interventions, investigations on the dopaminergic system, imaging of reporter gene expression in mice and antigen distribution using radiolabeled antibody fragments.^{4,5,6,7,8} The usefulness of PET imaging for the evaluation of tumor response after PDT has also been demonstrated.^{9,10}

The principle of PET imaging is depicted in Figure 1. A radiopharmaceutical labeled with a positron-emitting radionuclide is injected into the bloodstream of a subject. The radioisotope disintegration results in positron ejection. Positrons travel some distance within tissues (typically 1 to 3 mm) and are readily annihilated by an adjacent electron resulting in the emission of two 511 keV annihilation photons parting in opposite direction. PET scanners consist of rings of gamma ray detectors that register the emitted annihilation

photons in coincidence to generate cross-sectional images of the radioisotope distribution. Combinations of different image frames allow the reconstruction of the 3-D radioisotope distribution as a function of time.¹¹

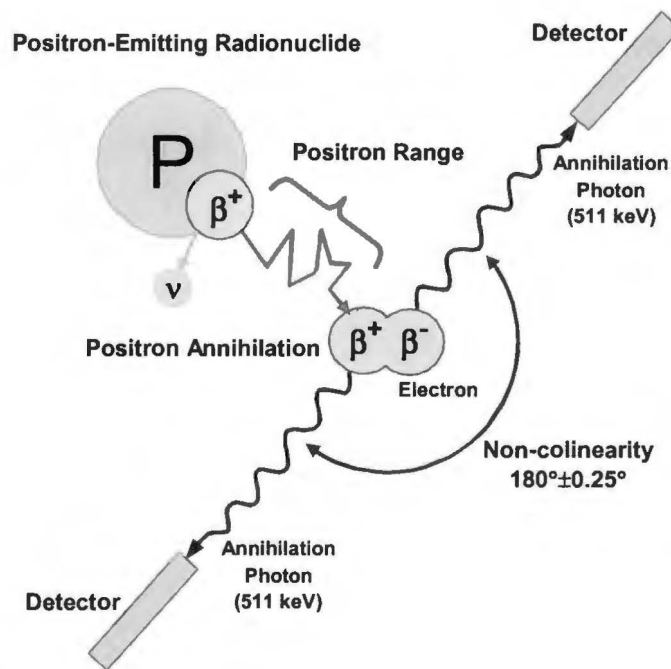


Figure 1 Basic physics of positron emission and annihilation photon detection in positron emission tomography (PET)

Many biomolecules have been labeled with positron emitters enabling the dynamic *in vivo* visualization of a wide range of biological processes.¹² The most widely used PET radiopharmaceutical is a fluorinated analog of glucose, 2-deoxy-2- ^{18}F fluoro-D-glucose (FDG).¹³ Enhanced glucose utilization by tumor cells, as compared to healthy surrounding tissues, combined with the rapid elimination of FDG from most other organs provides low background, high contrast images of tumor metabolic activity, i.e. a critical parameter for

cancer management and treatment follow up.¹⁴ The selective retention of FDG by tumor cells is a typical example of metabolic trapping of the intermediate FDG-6-PO₄, which is a poor substrate for subsequent enzymatic conversion. A number of radiopharmaceuticals labeled with positron emitting radionuclides have been developed or proposed for imaging various tumor parameters, including perfusion, hypoxia, apoptosis, and specific cellular receptors. While the administered mass of most non-specific radiotracers, such as FDG, is far too small to produce any pharmacological effects,¹⁵ in receptor-based imaging the injected mass could saturate the low density binding sites and lead to physiologic effects and non-linear kinetics.^{16,17}

In human oncology, the effect of therapy-induced changes on FDG tumor retention has been well documented.^{18,19,20} Decreased tumor uptake of FDG after chemo- and/or radiotherapy is generally considered to be an early indicator of a positive response to therapy. However, the presence of inflammatory cells²¹ and apoptotic response²² after the treatment may result in persistently high FDG levels concealing a positive tumor response. Up to a decade ago, resolution of clinical PET scanners limited quantitative PET studies to humans and large laboratory animals. However the development of high-resolution PET scanners dedicated to small-animal imaging opened the way to use rat and mice disease models for PET studies.⁵⁻

11,23

Conventional *in vitro* and *in vivo* methods to study treatment efficacy at the tissue level require a large number of animals and are labor intensive. With PET imaging, it is possible to perform repeated measurements on the same animal to evaluate responses early after, or

even during therapy, and to perform follow-up studies.⁹ Since the same animal can be used at different time points, variability caused by inter-animal differences is eliminated and furthermore, in many studies, each animal can serve as its own control.⁵ The well-known early effects of PDT combined with the above considerations suggest that PET is an ideal tool to study the rapid biochemical and physiological responses of tumors to PDT.

THE USE OF PET IN PDT

Although the number of published articles on the use of PET for the follow-up of PDT-treated tumors is limited, several preclinical studies have appeared attesting the potential usefulness of this non-invasive diagnostic tool to study both efficacy of new photosensitizing drugs and their action mechanisms. Moore et al.¹⁰ showed that metabolic effects induced by PDT can be visualized by FDG-PET to detect therapeutic response at an early stage after treatment. Mice inoculated with mammary carcinomas were treated with haematoporphyrin derivative (HPD) and light; subsequent FDG-PET scans showed a large reduction in glucose metabolism of the treated tumor. Furthermore a good correlation between FDG uptake by the treated tumor and the distribution of remaining viable tumor regions, as observed by histology, was evident. They also showed that any post-PDT viable tumor region detected on PET images correlated well with gamma counting of the excised tumors. Lapointe et al.⁹ also used FDG and a dedicated small animal PET scanner to assess early tumor response after PDT in a mouse model. Mice bearing two small murine mammary tumors on the back were treated by two different PS with known differences in action mechanisms²⁴, i.e. Photofrin and disulfonated aluminum phthalocyanine (AlPcS₂). Only one of the two tumors was exposed to light from a diode laser while the control tumor

was shielded from light exposure. FDG-PET scans were taken 30 min and 2 h post-PDT of one of the two tumors. The images (Figure 2) from this pilot study confirmed the feasibility of using dynamic *in vivo* small animal PET imaging for assessing metabolic changes in tumors early after PDT. Furthermore the use of different PS gave the first indication that the procedure can also be used for the early detection of differences in PDT response mechanisms. More recently Fei et al.²⁵ investigated image registration methods to combine magnetic resonance imaging (MRI) and FDG-micro-PET images for improved tumor monitoring in mice. They conclude that combining anatomical and functional information could be used for the potential application in PDT.

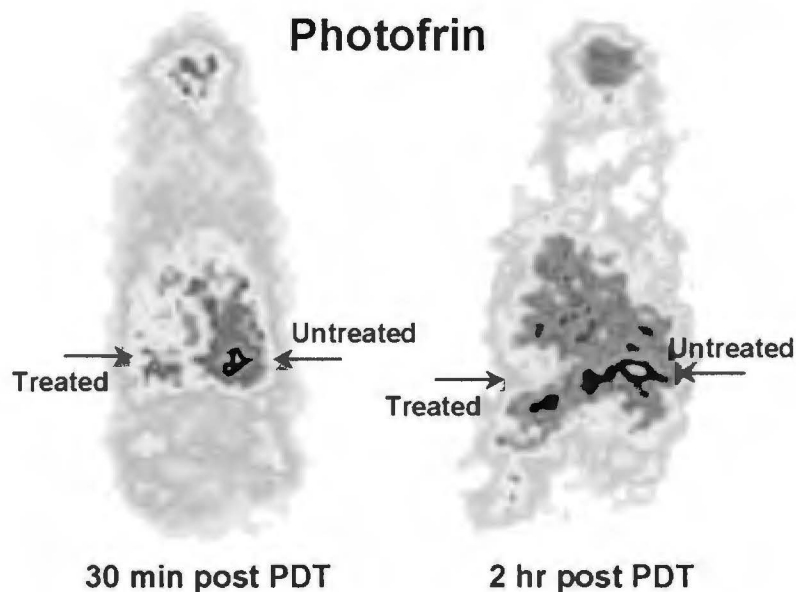


Figure 2 PET images of FDG biodistribution 30 min after administration in mice bearing two EMT-6 tumors

Animals received Photofrin 24 h before light exposure, FDG was administered 30 min (left) and 2 h (right) after PDT.

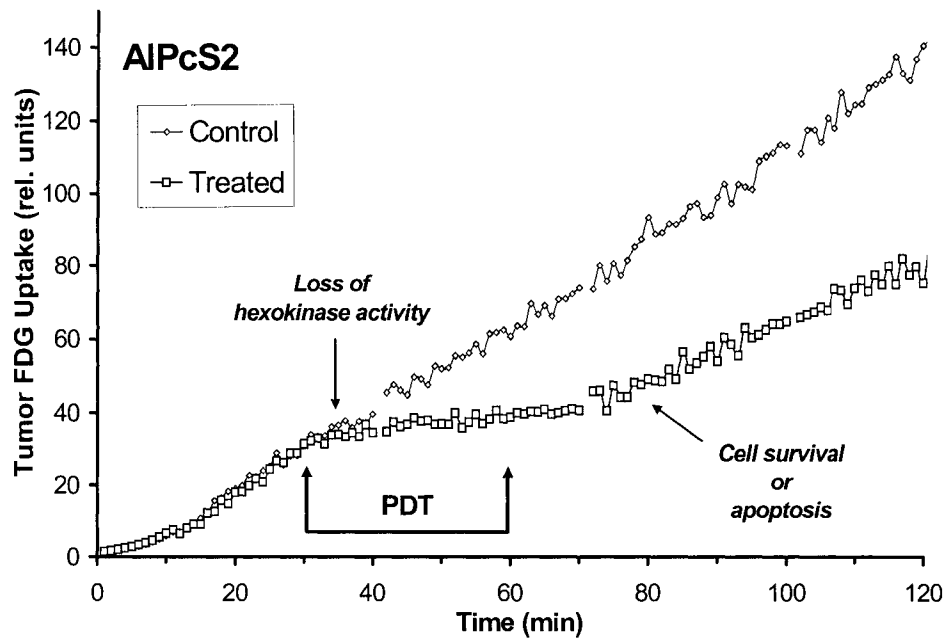
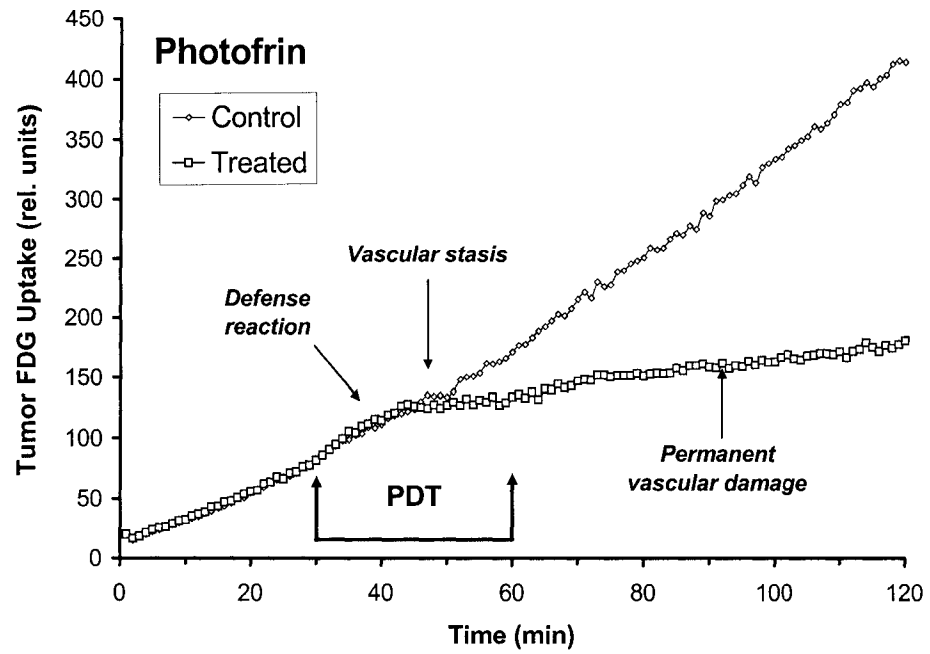
These FDG-PET studies clearly demonstrate the early effect of PDT on tumor glucose metabolism shortly after light exposure. This is in sharp contrast with visual examination of tumors²⁶ or other anatomic imaging modalities such as MRI or X-ray computed tomography (CT) as means to follow tumor response. Either procedure can only detect macroscopic damage normally appearing at a much later time after therapy. The above promising animal PET scans from preclinical studies on tumor PDT should encourage clinicians to implement FDG-PET in their assessment of PDT protocols to predict patient response at an early stage after treatment.²⁷

Understanding the pharmacokinetics of the PS is essential for optimizing PDT protocols of individual cancer patients. Most PS fluoresce upon light excitation allowing their quantification in tumors by fluorometry and reflectance spectrophotometry.^{28,29} PS have also been labeled with various radioisotopes including positron emitters to measure their biodistribution by scintigraphic procedures.³⁰ In particular, the availability of various positron emitting Cu-isotopes and the potential to label PS by substituting chelated metal ions for such isotopes would allow PET imaging to be used for assessing tumor PS-uptake profiles and for selecting optimal illumination times. This is a particularly attractive alternative over dissection and tissue analysis for the evaluation of animal PDT protocols and for the assessment of new PS efficacy.³¹ With small animal PET imaging technology now becoming available in many hospital centers, PET investigation of PDT protocols provides a link between preclinical and human studies, facilitating translation of basic research to the clinical setting.⁵

The chemical properties of PS determine its pharmacokinetics and cellular distribution pattern, which in turn affect the mechanisms by which PDT will induce tumor regression. In general, hydrophobic and amphiphilic drugs are capable of entering into neoplastic cells, resulting in direct cell kill upon light exposure, mainly by causing impairment of mitochondrial functions and disruption of intracellular membrane systems. In contrast, water-soluble photosensitizers mostly remain in the bloodstream and more likely kill tumor cells indirectly by initially damaging endothelial cells. This results in the release of a cascade of vaso-active compounds that induce vascular stasis, interrupting oxygen and nutrient supplies, and eventually resulting in indirect destruction of tumor cells.^{32,33}

In order to correlate the effect of chemical structure modifications on the action mechanism of PS, we developed a protocol whereby PDT response to photosensitizers can be followed by FDG-PET in a small-animal model in real-time, i.e. during the illumination phase.^{34,35} This real-time dynamic PET imaging method relies on continuous steady-state FDG administration that allows instantaneous quantification of changes in glucose metabolism during PDT as a function of time. The uptake behavior of FDG by the tumor before, during and after illumination shows a characteristic pattern reflecting the action mechanism of tumor response through direct vs. indirect tumor cell damage. For instance, PDT in conjunction with the clinically approved photosensitizer preparation Photofrin initially induces predominantly a vascular effect that results in a decrease of the FDG retention during the latter half of the illumination phase (Figure 3 upper). This drop in the FDG uptake rate is preceded by a slightly increased FDG retention that may reflect the initial defense reaction of endothelial cells. The FDG tumor uptake rate remains low after PDT

reflecting permanent vascular damage that gradually affects the viability of the tumor cells (Figure 3 upper). In contrast AlPcS₂-PDT induces substantial direct tumor cell damage during PDT characterized by a very rapid and significant drop in FDG uptake in the treated tumor at the onset of light exposure (Figure 3 middle). Although the initial drop in FDG retention most likely results from inactivation of cell hexokinase and/or glucose transporter, subsequent increase in FDG uptake may reflect cell survival or possibly induction of apoptosis (Figure 3 middle). The latter is a common mechanism of direct cell death after PDT.³⁶ Furthermore it is well established that the apoptotic process requires ATP, which in turn requires glucose for its production.^{37,38} Thus increase of FDG uptake after tumor irradiation, as seen in the last part of the FDG-uptake curve of Figure 3 middle, likely reflect apoptotic activity of dying cells. Nevertheless, initial macrophage cell invasion¹⁹ and residual viable tumor cells may also contribute to the observed rise in the tumor FDG-uptake. The differences between the two PDT response mechanisms are even more evident from the differential FDG uptake rates between the treated and nontreated tumors (Figure 3 lower). In the case of Photofrin-PDT, a delayed single response in the FDG uptake rate, reflecting permanent vascular stasis, is observed while in the case of the AlPcS₂-PDT a bi-phase response is evident corresponding to initial cellular damage followed by partial recovery and induction of apoptosis. Such observations are in agreement with earlier reports on the action mechanisms of these two PS, as determined by conventional PDT response data.^{39,40}



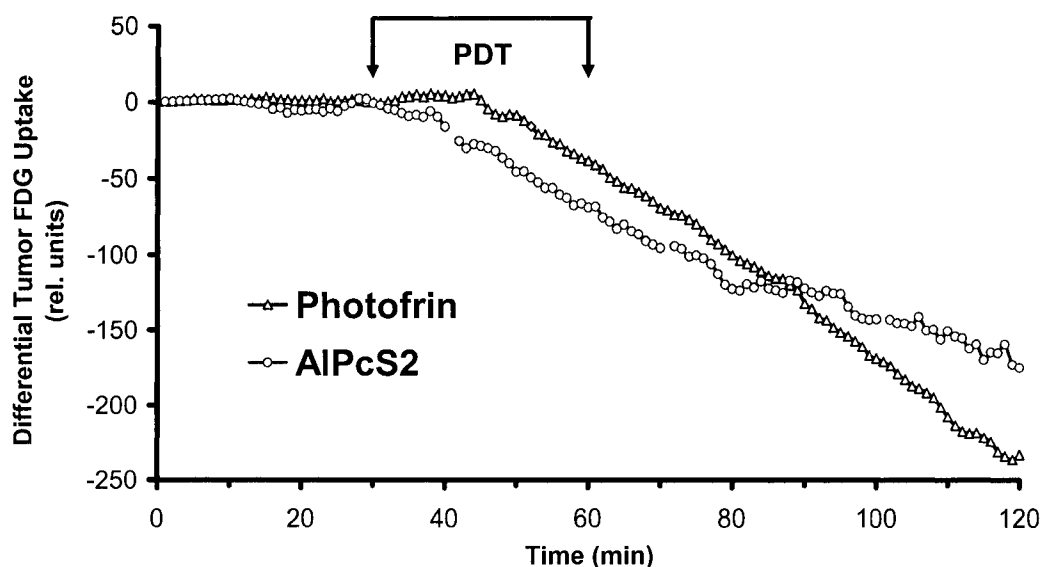
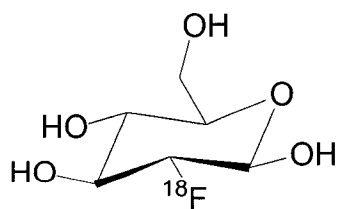


Figure 3 Real-time FDG uptake variations during PDT

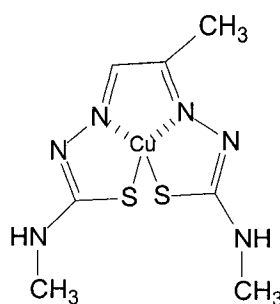
Animals implanted with two EMT-6 tumors received iv 10 mg/kg Photofrin (upper figure) or 1 mg/kg disulfonated Al phthalocyanine (AlPcS₂) (middle figure) followed 24 h later by light exposure from a diode laser (30 min, 630 nm and 680 nm, respectively, 400 J/cm²) of one of the two tumors. FDG was infused continuously during and after PDT for a total period of 2-h and PET images were collected every 60 seconds. Differential FDG uptake ratios (lower figure) between the treated and non-treated tumor reveals differences in Photofrin versus AlPcS₂-PDT tumor response. Photofrin-PDT induces a drop in the FDG uptake rate halfway during illumination that persists after the light treatment, characteristic for irreversible vascular damage. In contrast AlPcS₂-PDT induces a bi-phase response, i.e. immediate decrease in FDG uptake upon initiation of light exposure followed by partial recovery after termination of the treatment, characteristic for direct tumor cell damage during PDT.

In addition to imaging the effect of PDT on glucose metabolism, new radiotracers are being developed that allow early visualization of other critical tumor response parameters.^{41,42} These include PET radiopharmaceuticals to follow changes in blood flow and to detect

apoptotic response in the treated tumor. A tracer to follow blood perfusion would be of particular interest to characterize PDT response since tumor regression likely results from a combination of both direct cell kill and vascular stasis. A promising PET tracer for such real-time animal studies is ^{64}Cu -labeled pyruvaldehyde bis(N^4 -methylthiosemicarbazone)-copper(II) (Cu-PTSM) (Figure 4). This agent has been successfully used as a blood flow tracer to image perfusion in the brain,⁴³ heart⁴⁴ and kidneys.⁴⁵ Upon intravenous injection, Cu-PTSM shows high and prolonged levels of radioactivity in well perfused organs.⁴⁶ In oncology, a PET blood flow tracer is essential to evaluate tumor pathophysiology and to plan and monitor therapeutic intervention.⁴⁷ Mathias et al.⁴⁸ studied tumor perfusion with Cu-PTSM in a dog tumor model, showing its compatibility with radiolabeled microspheres, the conventional gold standard to confirm blood flow measurements. Although the radiation properties of ^{64}Cu (12.7 h, 18% β^+ , 40% β^-) are not ideal for human diagnostic applications, substitution for ^{60}Cu (24 min, 93% β^+), ^{61}Cu (3.4 h, 61% β^+) or ^{62}Cu (9.7 min, 98% β^+) would render this radiopharmaceutical suitable for perfusion studies in humans by PET. This was confirmed by a human study with ^{62}Cu -PTSM using [^{15}O]-water as a reference.⁴⁹ Hence, Cu-PTSM can be readily used in conjunction with FDG to characterize tumor response to PDT by PET, both in animal as well as human studies.



FDG



Cu-PTSM

Figure 4 Chemical structures of 2-deoxy-2-fluoro-D-glucose (FDG) and pyruvaldehyde bis(N⁴-methylthiosemicarbazone)-copper(II) (Cu-PTSM)

Programmed cell death (apoptosis) is characterized by externalization of phosphatidylserine. To visualize apoptosis after tumor treatment, radiolabeled annexin V, with its strong affinity for phosphatidylserine, has been the tracer of choice.^{50,51} Labeled with the readily available single photon emitter ^{99m}Tc, the tracer has been used in clinical studies⁵² as well as animal studies to follow apoptosis after PDT.⁵³ Annexin V has also been labeled with positron emitters such as ¹²⁴I.⁵⁴ More recently apoptosis after PDT in a mouse tumor model was visualized with high contrast using pretargeted ⁶⁴Cu.⁵⁵ In this three-step procedure animals were injected with biotinylated annexin V followed by an avidin chase to eliminate free biotin; apoptosis was then detected by PET imaging using a ⁶⁴Cu-DOTA-biotin-streptavidin complex. This pre-targeting procedure is being considered for measuring apoptosis resulting from PDT.

CONCLUSIONS

With the general spread of FDG-PET for routine diagnostic medicine in cancer management, and the availability of dedicated animal PET scanners in many research

centers, the use of FDG and PET in drug development and cancer research is finding rapid acceptance. The use of FDG-PET in preclinical photodynamic therapy is of particular interest since the latter is one of the few therapeutic interventions that allows for PET imaging during light exposure, that is, during the actual therapeutic step. In addition to visualizing real-time metabolic treatment response, the procedure can be extended to include PET tracers to follow changes in blood flow, or more specific response mechanisms such as the induction of apoptosis.

ACKNOWLEDGEMENTS

Parts of this work were supported by the Canadian Institutes for Health Research (CIHR grants MOP-44065 and MOP-15348).

REFERENCES

- ¹ Dougherty TJ. Photosensitizers: therapy and detection of malignant tumors. *Photochem Photobiol* 1987; 45:837-841.
- ² Allen CM, Sharman WM, van Lier JE. Current status of phthalocyanines in the photodynamic therapy of cancer. *J Porphyrins Phthalocyanines* 2001; 5:161-169.
- ³ Oleinick NL, Evans HH. The photobiology of photodynamic therapy: cellular targets and mechanisms. *Radiat Res* 1998; 150:S146-S156.
- ⁴ Tatsumi M, Nakamoto Y, Traughber B, Marshall LT, Geschwind J-FH, Wahl RL. Initial experience in small animal tumor imaging with a clinical positron emission tomography/computed tomography scanner using 2-[F-18]Fluoro-2-deoxy-D-glucose. *Cancer Res* 2003; 63:6252-6257.
- ⁵ Chatziioannou AF. PET scanners dedicated to molecular imaging of small animal models. *Mol Imaging Biol* 2002; 4(1):47-63.
- ⁶ Rowland DJ, Lewis JS, Welch MJ. Molecular imaging : The application of small animal positron emission tomography. *J Cell Biochem* 2002; 39(Suppl.):110-115.
- ⁷ Myers R. The biological application of small animal PET imaging. *Nucl Med Biol* 2001; 28:585-593.
- ⁸ Meikle SR, Eberl S, Iida H. Instrumentation and methodology for quantitative pre-clinical imaging studies. *Curr Pharma* 2001; 7:1945-1966.
- ⁹ Lapointe D, Brasseur N, Cadorette J, La Madeleine C, Rodrigue S, van Lier JE, Lecomte R. High-resolution PET imaging for in vivo monitoring of tumor response after photodynamic therapy in mice. *J Nucl Med* 1999; 40(5):876-882.
- ¹⁰ Moore JV, Waller ML, Zhao S, Dodd N, Acton PD, Jeavons AP, Hastings DL. Feasibility of imaging photodynamic injury to tumours by high-resolution positron emission tomography. *Eur J Nucl Med* 1998; 25(9):1248-1254.
- ¹¹ Cherry SR, Gambhir SS. Use of positron emission tomography in animal research. *ILAR Journal* 2001; 42(3):219-232.
- ¹² Phelps ME. PET: A biological imaging technique. *Neurochem Res* 1991; 16:929-940.
- ¹³ Collier TL, Lecomte R, McCarthy T, Meikle S, Ruth TJ, Scopinaro F, Signore A, VanBrocklin H, Van de Wiele C, Waterhouse RN. Assessment of cancer associated biomarkers by positron emission tomography: advances and challenges. *Disease Markers* 2002; 18(5-6):211-247.

-
- 14 Chaiken L, Rege S, Hoh C, Choi Y, Jabour B, Juillard G, Hawkins R, Parker R. Positron emission tomography with fluorodeoxyglucose to evaluate tumor response and control after radiation therapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1993; 27(2):455-464.
- 15 Phelps ME. Positron emission tomography provides molecular imaging of biological processes. *PNAS* 2000; 97(16):9226-9233.
- 16 Hume SP, Gunn RN, Jones T. Pharmacological constraints associated with positron emission tomographic scanning of small laboratory animals. *Eur J Nucl Med* 1998; 25(2):173-176.
- 17 Jagoda EM, Vaquero JJ, Seidel J, Green MV, Eckelman WC. Experiment assessment of mass effects in the rat: implications for small animal PET imaging. *Nucl Med Biol* 2004; 31:771-779.
- 18 Price P, Jones T. Can positron emission tomography (PET) be used to detect subclinical response to cancer therapy? *Eur J Cancer* 1995; 31A(12):1924-1927.
- 19 Findlay M, Young H, Cunningham D, Iveson, A, Cronin B, Hickish T, Pratt B, Husband J, Flower M, Ott R. Noninvasive monitoring of tumor metabolism using fluorodeoxyglucose and positron emission tomography in colorectal cancer liver metastases: Correlation with tumor response to fluorouracil. *J Clin Oncol* 1996; 14(3):700-708.
- 20 Schulte M, Brecht-Krauss D, Werner M, Hartwig E, Sarkar MR, Keppler P, Kotzerke J, Guhlmann A, Delling G, Reske SN. Evaluation of neoadjuvant therapy response of osteogenic sarcoma using FDG PET. *J Nucl Med* 1999; 40:1637-1643.
- 21 Smith TAD. FDG uptake, tumour characteristics and response to therapy: A review. *Nucl Med Commun* 1998; 19:97-105.
- 22 Derradji H, Baatout S. Apoptosis: A Mechanism of Cell Suicide. *In Vivo* 2003; 17:185-192.
- 23 Lecomte R, Cadorette J, Rodrigue S, Lapointe D, Rouleau D, Bentourkia M, Yao R, Msaki P. Initial results from the Sherbrooke avalanche photodiode positron tomograph. *IEEE Trans Nucl Sci.* 1996; 43(3):1952-1957.
- 24 Chan WS, Brasseur N, La Madeleine C, van Lier JE. Evidence for different mechanisms of EMT-6 tumor necrosis by photodynamic therapy with disulfonated aluminum phthalocyanine or Photofrin : tumor cell survival and blood flow. *Anticancer Res* 1996; 16:1887-1892.
- 25 Fei B, Muzic FR, Lee Z, Flask CA, Morris RL, Duerk JL, Oleinick N, Wilson DL. Registration of micro-PET and high-resolution MR images of mice for monitoring photodynamic therapy. *Proc SPIE* 2004; 5369:371-379.

-
- 26 Margaron P, Madarnas P, Ouellet R, van Lier JE. Biological activities of phthalocyanines, XVII: histopathologic evidence for different mechanisms of EMT-6 tumor necrosis induced by photodynamic therapy with disulfonated aluminum phthalocyanine or Photofrin. *Anticancer Res* 1996; 16:613-620.
- 27 Moore JV, West CML, Whitehurst C. The biology of photodynamic therapy. *Phys Med Biol* 1997; 42:913-935.
- 28 Profio AE, Sarnaik J. Fluorescence of HpD for tumor detection and dosimetry in photoradiation therapy. In : Doiron DR, Gomer CJ, Editors. *Porphyrin localization and treatment of tumors*. New York : AR Liss, 1984.
- 29 Patterson MS, Wilson BC, Feather JW, Burns DM, Pushka W. The measurement of dihematoporphyrin ether concentration in tissue by reflectance spectrophotometry. *Photochem Photobiol* 1987; 46:337-343.
- 30 Wilson BC, van Lier JE. Radiolabelled photosensitizers for tumour imaging and photodynamic therapy. *J Photochem Photobiol* 1989; 3:459-463.
- 31 Marriott CJ, Cadorette JE, Lecomte R, Scasnar V, Rousseau J, van Lier JE. High-resolution PET imaging and quantitation of pharmaceutical biodistributions in a small animal using avalanche photodiode detectors. *J Nucl Med* 1994; 35:1390-1397.
- 32 Milanesi C, Zhou C, Biolo R, Jori G. Zn(II)-phthalocyanine as a photodynamic agent for tumours. II. Studies on the mechanism of photosensitized tumour necrosis. *Br J Cancer* 1990; 61:846-850.
- 33 Rosenthal I. Phthalocyanines as photodynamic sensitizers. *Photochem Photobiol* 1991; 53:859-870.
- 34 Lecomte R, Bentourkia M, Lapointe D, van Lier JE. Real-time monitoring of tumor metabolism during photodynamic therapy by steady-state FDG-PET imaging. *J Nucl Med* 2001; 42(5):26P-27P.
- 35 Bérard V, Rousseau J, Cadorette J, Hubert L, Bentourkia M, van Lier JE, Lecomte R. Application of small animal PET imaging for real-time monitoring of tumor cell metabolic activity during photodynamic therapy. *Mol Imag Biol* 2003; 5(3):99.
- 36 Oleinick NL, Evans HH. The photobiology of photodynamic therapy: cellular targets and mechanisms. *Radiat Res* 1998; 150(Suppl.):S146-S156.
- 37 Oberdanner CB, Kiesslich T, Krammer B, Plaetzer K. Glucose is required to maintain high ATP-levels for the energy-utilizing steps during PDT-induced apoptosis. *Photochem Photobiol* 2002; 76(6):695-703.

-
- 38 Mankoff DA, Muzi M, Krohn KA. Quantitative positron emission tomography imaging to measure tumor response to therapy : what is the best method? *Mol Imaging Biol* 2003; 5(5):281-285.
- 39 Fingar VH, Wieman TJ, Karavolos PS, Doak KW, Ouellet R, van Lier JE. The effects of photodynamic therapy using differently substituted zinc phthalocyanines on vessel constriction, vessel leakage and tumor response. *Photochem Photobiol* 1993; 58(2):251-258.
- 40 Peng Q, Moan J, Nesland JM, Rimington C. Aluminum phthalocyanines with asymmetrical lower sulfonation and with symmetrical higher sulfonation: a comparison of localizing and photosensitizing mechanism in human tumor LOX xenografts. *Int J Cancer* 1990; 46:719-726.
- 41 Britz-Cunningham SH, Adelstein SJ. Molecular targeting with radionuclides: State of the science. *J Nuclear Med* 2003; 44:1945-1961.
- 42 Solomon B, McArthur GA, Cullinane C, Zalberg JR, Hicks RJ. Applications of positron emission tomography in the development of molecular targeted cancer therapeutics. *BioDrugs* 2003; 17(5):339-54.
- 43 Green MA, Mathias CJ, Welch MJ, McGuire AH, Perry D, Fernandez-Rubio F, Perlmutter JS, Raichle ME, Bergmann SR. Copper-62-labeled pyruvaldehyde bis(N⁴-methylthiosemicarbazonato)copper(II): synthesis and evaluation as a positron emission tomography tracer for cerebral and myocardial perfusion. *J Nucl Med* 1990; 31:1989-1996.
- 44 Beanlands RS, Muzik O, Mintun M, Mangner T, Lee K, Petry N, Hutchins GD, Schwaiger M. The kinetics of copper-62-PTSM in the normal human heart. *J Nucl Med* 1992; 33:684-690.
- 45 Shelton ME, Green MA, Mathias CJ, Welch MJ, Bergmann SR. Assessment of regional and renal blood flow using copper-PTSM and positron emission tomography. *Circulation* 1990; 82:990-997.
- 46 John EK, Green MA. Structure-activity relationships for metal-labeled blood flow tracers: comparison of keto aldehyde bis(thiosemicarbazonato)copper(II) derivatives. *J Med Chem* 1990; 33:1764-1770.
- 47 Hawkins RA, Phelps M.E. PET in clinical oncology. *Cancer Metastasis Rev* 1988; 7:119-142.
- 48 Mathias CJ, Green MA, Morrison WB, Knapp, D.W. Evaluation of Cu-PTSM as a tracer of tumor perfusion: comparison with labeled microspheres in spontaneous canine neoplasms. *Nucl Med Biol* 1994; 21(1):83-87.

-
- 49 Wahl RL, Zasadny K, Koeppe RA, Mangner T, Mintun MA, Lee KS, Cody RS. Initial evaluation of Cu-62 PTSM as a tumor blood flow agent in man: comparison studies with O-15 water. J Nucl Med 1993; 34:224-225.
- 50 Blankenberg FG, Katsikis PD, Tait JF, Davis RE, Naumovski L, Ohtsuki K, Kopiwoda , Abrams MJ, Darkes M, Robbins RC, Maecker HT, Strauss HW. In vivo detection and imaging of phosphatidylserine expression during programmed cell death. Proc Natl Acad Sci USA 1998; 95:6349-6354.
- 51 Blankenberg FG. Recent advances in the imaging of programmed cell death. Curr Pharm Des 2004; 10:1457-67.
- 52 van de Wiele C, Lahorte C, Vermeersch H, Loose D, Mervillie K, Steinmetz ND, Vanderheyden JL, Cuvelier CA, Slegers G, Dierck RA. Quantitative tumor apoptosis imaging using technetium-99m-HYNIC annexin V single photon emission computed tomography. J Clin Oncol 2003;21:3483-3487.
- 53 Subbarayan M, Hafeli UO, Feyes DK, Unnithan J, Emancipator SN, Mukhtar H. A simplified method for preparation of ^{99m}Tc-annexin V and its biologic evaluation for in vivo imaging of apoptosis after photodynamic therapy. J Nucl Med 2005;44:650-65.6.
- 54 Glaser M, Collingridge DR, Aboagye EO, Bouchier-Hayes L, Hutchinson OC, Martin SJ, Price P, Brady F, Luthra SK. Iodine-124 labelled annexin-V as a potential radiotracer to study apoptosis using positron emission tomography. Appl Radiat Isot 2003; 58:55-62.
- 55 Cauchon N, Langlois R, Lecomte R, Rousseau J, Zeisler SK, Pavan RA, Hunting DJ, van Lier JE. Apoptosis after photodynamic therapy : *in vivo* detection by small animal PET using a streptavidin-biotin-DOTA-copper-64 complex. J Nucl Med 2004; 45(5):51P-52P.

2 - Article 2 : “Dynamic Imaging of Transient Metabolic Processes by Small-Animal PET for the Evaluation of Photosensitizers in Photodynamic Therapy of Cancer”

Cet article rapporte les résultats de nos travaux évaluant le potentiel de l'imagerie TEP en temps réel dans l'investigation du mécanisme d'action de différents photosensibilisateurs durant la thérapie photodynamique du cancer chez le rat. L'observation de processus métaboliques transitoires distincts via l'analyse des courbes de la captation tumorale du [^{18}F]-FDG avant, pendant et après l'illumination s'est avérée être une façon rapide de discriminer si les photosensibilisateurs étudiés agissaient de façon directe ou indirecte sur la mort des cellules tumorales. Le protocole expérimental d'imagerie utilisé se retrouve à l'Annexe 1.

Voici la référence complète pour consulter la version finale et publiée de l'article 2 :

Dynamic Imaging of Transient Metabolic Processes by Small-Animal PET for the Evaluation of Photosensitizers in Photodynamic Therapy of Cancer
V. Bérard, J.A. Rousseau, J. Cadorette, L. Hubert, M. Bentourkia, J.E. van Lier and R. Lecomte
J Nucl Med, July 2006; 47(7):1119–1126.

Il est à noter que cette publication a aussi fait l'objet d'un éditorial (« Invited Perspective ») intitulé:

Dynamic Imaging of Transient Metabolic Processes: PDT Is Just the Beginning
P. Acton
J Nucl Med, July 2006; 47(7):1067-1069.

**DYNAMIC IMAGING OF TRANSIENT METABOLIC PROCESSES BY SMALL ANIMAL POSITRON
EMISSION TOMOGRAPHY FOR THE EVALUATION OF PHOTSENSITIZERS IN
PHOTODYNAMIC THERAPY OF CANCER**

Véronique Bérard, Jacques A. Rousseau, Jules Cadorette, Laurent Hubert, M'hamed
Bentourkia, Johan E. van Lier and Roger Lecomte

Sherbrooke Molecular Imaging Centre,
Étienne-LeBel Clinical Research Centre,
Centre hospitalier universitaire de Sherbrooke and
Department of Nuclear Medicine and Radiobiology,
Faculty of Medicine and Health Sciences,
Université de Sherbrooke, Sherbrooke, QC, Canada J1H 5N4

Abbreviated Title: Dynamic PET Imaging in PDT.

Word Count: 5625 words.

Financial Support: Canadian Institutes of Health Research (CIHR) grants MOP-44065 and
MOP-15348.

Corresponding author:

Roger Lecomte, Ph.D.
Dept of Nuclear Medicine and Radiobiology
Faculty of Medicine and Health Sciences
Université de Sherbrooke
3001, 12th Avenue N., CRC/CHUS #1864
Sherbrooke, QC, Canada, J1H 5N4
Phone: (819) 820-6868 x. 14608 or 11864
Fax: (819) 829-3238
Email: Roger.Lecomte@USherbrooke.ca

First author:

Véronique Bérard, M.Sc. (Student)
Dept of Nuclear Medicine and Radiobiology
Faculty of Medicine and Health Sciences
Université de Sherbrooke
3001, 12th Avenue N., CRC/CHUS #1859
Sherbrooke, QC, Canada, J1H 5N4
Phone: (819) 820-6868 x. 11889
Fax: (819) 829-3238
Email: Veronique.Berard@USherbrooke.ca

ABSTRACT

The potential use of dynamic positron emission tomography (PET) to monitor transient metabolic processes and to investigate the action mechanisms of new photosensitizing drugs in the photodynamic therapy (PDT) of cancer is evaluated.

METHODS: Rats bearing two mammary tumors received different phthalocyanine-based photosensitizers. The following day, animals were positioned in the Sherbrooke small animal PET scanner and continuously infused with 2-deoxy-2-[^{18}F]fluoro-D-glucose (FDG) while acquiring dynamic images for a total duration of two hours. During that period, one of the two tumors was exposed for 30 minutes to red light delivered by a small diode laser to activate PDT.

RESULTS: FDG time-activity curves during PDT show distinct transient patterns characterized by a drop and subsequent recovery of the tumor FDG uptake rates. Variations in these rates and response delay parameters reveal tumoral and systemic metabolic processes that correlate to differences in action mechanisms between the drugs, i.e. direct tumor cell kill or initial vascular shut-down.

CONCLUSION: Real-time follow-up of tumor response to photodynamic therapy as monitored by dynamic FDG-PET imaging has been shown to correlate with the action mechanisms of photosensitizing drugs in vivo. This new imaging paradigm can be exploited to monitor a variety of transient cellular and molecular processes as they occur in vivo, enabling the action mechanisms of therapeutic interventions to be scrutinized and their efficacy to be predicted in real-time.

KEYWORDS: Small animal positron emission tomography (PET); FDG; Photodynamic therapy (PDT); Photosensitizer; Transient metabolic process; Tumor.

INTRODUCTION

Photodynamic therapy (PDT) is a promising treatment for light-accessible tumors (1). This type of therapy combines tumor-localizing photosensitizers (PS), visible light and molecular oxygen to induce oxidative damage to the tumor tissue (2). Most clinical applications of PDT use Photofrin (3), a mixture of hematoporphyrin derivatives, but second-generation photosensitizers such as the metallo-phthalocyanines (Pc) with better photochemical properties than Photofrin have been developed (4). Phthalocyanines form stable chelates with metal cations such as Zn^{2+} and Al^{3+} and the addition of sulfonato groups at the periphery of the macro cycle gives water-soluble PS with well documented potential for use in clinical PDT (5). The results of many studies of PDT in rodents have provided evidence for two types of response mechanisms that lead to tumor regression (6). PDT may cause direct tumor cell kill and/or activate endothelial cells to release vasoactive compounds that provoke vascular stasis followed by indirect damage to malignant cells. In addition to cell and/or vascular damage, release of vasoactive components may produce an inflammatory response into the tumor and surrounding tissues. The relative contribution of the two main pathways to the overall tumor response depends on the distribution of the photosensitizer among cell/vascular compartments, which in turn depends on the chemical nature of the photosensitizing drug (7). More hydrophobic or amphiphilic photosensitizers such as disulfonated ZnPcS_2 are preferentially transported by lipoproteins which are taken-up directly by tumor cells, while hydrophilic photosensitizers such as tetrasulfonated AlPcS_4 , are largely transported by albumin and mainly deposited in the vascular stroma of tumors (8). It follows that ZnPcS_2 -PDT largely induces direct cell kill, while AlPcS_4 -PDT initially affects the tumor vascular system followed by indirect tumor cell death (9, 10).

Small animal positron emission tomography (PET) is an excellent in vivo method to investigate various processes in molecular biology, oncology and neuroscience research (11-14). In oncological PET studies, the most widely used radiopharmaceutical for the evaluation of tumor glucose metabolic rates is 2-deoxy-2- ^{18}F fluoro-D-glucose (FDG) (15, 16). FDG-PET imaging appears to be also a very promising method to study the effect of photodynamic therapy in vivo, either to assess the efficacy of a photosensitizing drug or to determine its mechanism of action (17, 18). In our previous study, it was shown that the tissue uptake pattern of FDG and the reduced metabolic activity of the treated tumor measured by PET imaging at different time points post-PDT could be correlated with the action mechanisms of PDT through indirect vascular stasis or direct cell kill (17). It was observed, in particular, that the PDT drug targeting the vascular system caused an early drop of FDG uptake in the treated tumor, within less than 30 minutes after the end of the PDT light treatment. In contrast, the effect of the PDT drug acting directly on the tumor cells appeared to be delayed by about 2 hours post-treatment.

Whereas these studies provided clear evidence of dissimilar modes of action for the two different PDT drugs, the simple measurement of FDG tumor uptake at two time points gave little insight into the actual action mechanisms leading to inactivation of the tumor cells. Further investigations of the tumor metabolism at specific time intervals after illumination by the Patlak method confirmed these findings (19), but were of little help to unravel the early biological processes during and immediately after the end of the light treatment, which result in tumor cell obliteration. This is because there are two major problems with the conventional dynamic PET imaging approach following a bolus injection of the radiotracer.

First, the long uptake period of FDG by tumors (>30 min) does not allow an instantaneous measurement of the metabolic state of the tumor tissues, but rather represents some average value over a specified time interval. This is fine for a tumor (or any other tissue) in a steady state, but rather confounding for tissues undergoing rapid transient metabolic processes. The second related problem is that the effect of the PDT treatment is continuing to evolve during the FDG uptake period, hence preventing any instantaneous transient metabolic processes to be clearly differentiated.

In this study, the potential of real-time dynamic FDG-PET imaging using a constant radiotracer infusion has been explored as a means to evaluate the role of the photosensitizer's nature in the PDT tumor response mechanism. The ZnPcS₂ and AlPcS₄ photosensitizers selected for this study are known to induce tumor regression via different pathways, i.e. direct or indirect tumor cell kill, respectively.

MATERIALS AND METHODS

Photosensitizers

Adjacently disulfonated ZnPcS₂ and tetrasulfonated AlPcS₄ [Fig. 1] were synthesized by the condensation method as previously detailed (20). A few milligrams of Pc were dissolved in 1 mM phosphate-buffered saline (PBS) and sonicated for a few minutes. The solutions were filtered on Millex-GV 0.22 μm (Millipore) under sterile conditions. The concentration of the dye solutions was determined by UV-vis spectroscopy after dilution in dimethyl formamide ($\epsilon = 2.5 \times 10^{-5} \text{ (mol/L)}^{-1}\text{cm}^{-1}$ at $\lambda = 675 \text{ nm}$). The working solutions of ZnPcS₂ and AlPcS₄ were prepared by diluting the stock solutions in PBS such as to give a final drug

dose of 1 and 7.2 $\mu\text{mol/kg}$, respectively, in a total volume of 1 ml/100 g body weight.

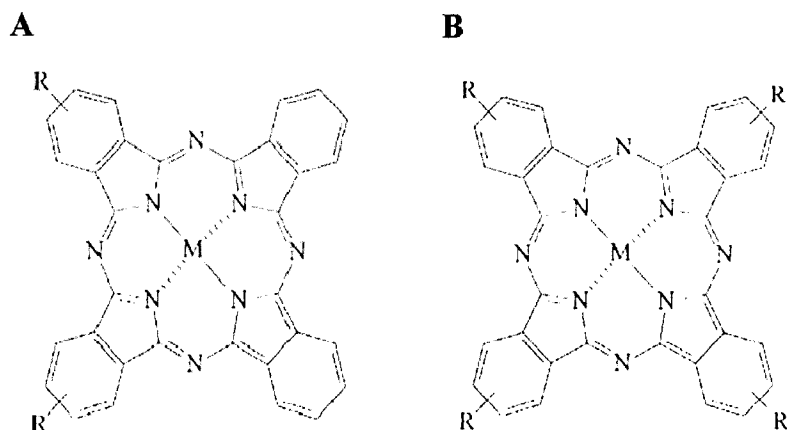


Figure 1 Chemical structure of ZnPcS_2 (A) and AlPcS_4 (B), where $\text{R} = \text{SO}_3^-$ and $\text{M} = \text{Zn}$ and Al , respectively.

Animal model

All experiments were performed on Fischer 344/CRBL female rats (150-160 g) (Charles River Breeding Laboratories, Montreal, Quebec, Canada) bearing two 13762 mammary adenocarcinoma (MAC). The experiments were conducted following a protocol approved by the Canadian Council on Animal Care and the in-house ethics committee. Animals were allowed free access to water and food throughout the experiments, except for the night preceding the FDG-PET study where they were fasting.

Tumor implantation

Mammary adenocarcinoma (MAC) tumor cells (2.25×10^6 cells in 0.15 ml of PBS) were intradermally implanted in both axillary areas of the rats. The two tumors were allowed to grow 7 days before the PET-PDT studies (tumor size: length, $l=14.4\text{-}15.1$ mm; width,

w=9.8-11.9 mm; thickness, h=7.6-8.2 mm). Tumor volume was measured externally with an electronic caliper according to a hemiellipsoid model $[1/2 (4\pi/3) \times (l/2) \times (w/2) \times h]$. No tumor necrosis was evident at the time of treatment.

Photodynamic therapy

The day before the PDT-PET study, rats were given 1 $\mu\text{mol/kg}$ of ZnPcS_2 or 7.2 $\mu\text{mol/kg}$ of AlPcS_4 through the tail vein (iv in 1 ml PBS/100 g body weight), representing the minimal dye dose required for total tumor regression after PDT. The PDT light treatment was applied 24 h post-dye administration during the FDG-PET imaging study (see below). One tumor was illuminated with a 670 nm light beam delivered via a fiber optic by a diode laser (B&W Teck Inc., model BWF-670-300) while the other tumor was masked and served as a control. The light beam was spread uniformly over the whole tumor area and maintained for a total period of 2000 seconds at a fluence rate of 200 mW/cm^2 to give a total fluence of 400 J/cm^2 .

PET studies

PET scans were performed with the Sherbrooke small animal PET scanner (21). The scanner is made of two avalanche photodiode detector rings and produces three image planes (2 direct, 1 cross) over a 1-cm axial field of view. The scanner flexible list mode data acquisition system allows elaborate dynamic PET image series to be extracted as desired. The rats were anesthetized (2.5% isoflurane in medical O_2) and cannulated with a butterfly (VenisystemsTM, Butterfly[®]-25 Short) in the tail vein. The position of the scanner bed was adjusted in order to place the tumors at the center of the axial field of view with the help of a

laser pointer. Thirty minutes before the onset of illumination, a continuous infusion of FDG (~250 MBq in 0.96 ml of PBS at 0.008 ml/min) was started while at the same time a 2-h dynamic PET image acquisition was launched. Illumination of one tumor was carried out for 2000 seconds, as described above, while PET imaging continued for about another hour post-PDT to complete the total 2-h scan sequence. The vital signs of the animals were monitored and recorded throughout the 2-h period to ensure a stable physiological status at all times. PET images consisting of 120 frames of 60 sec each were sorted out from the list-mode data for each of the 3 planes and reconstructed by a maximum likelihood expectation maximization (MLEM) reconstruction algorithm implementing detector response (22). Four rats were scanned for each photosensitizer. Controls included scans of two rats that received photosensitizer but no light and scans of two rats that received light but no photosensitizer.

Image analysis

Regions of interest were traced on the control and treated tumors of the last frame on the dynamic image series and applied on all the preceding frames. Time-activity curves corrected for radionuclide decay were generated and a mathematical model was used to fit 3 distinct parts of the curves corresponding to the radiotracer uptake before, during and after the illumination period. The following equations were used to fit the curves from the treated as well as from the untreated tumors:

$$f_1(t) = m_1 t - b_1 \left(1 - e^{-m_1 t / b_1}\right) \quad 0 \leq t \leq T_i \quad (\text{Eq. 1A})$$

$$f_2(t) = m_2 t - b_2 \quad T_i + \Delta 1 \leq t \leq T_f \quad (\text{Eq. 1B})$$

$$f_3(t) = m_3 t - b_3 \quad T_f + \Delta 2 \leq t \leq 120 \text{ min} \quad (\text{Eq. 1C})$$

where t is the time, m_1 , m_2 , m_3 are the slope values representing the tumor FDG uptake rates before, during and after PDT illumination, respectively. The b_i are fitting parameters that have no special meaning. Two additional parameters were introduced to describe the duration of the transient states resulting from the intervention which can be observed from the tumor FDG-uptake curves: $\Delta 1$, the time lag between the beginning of illumination T_i and the start of a drop in the FDG uptake rate; and $\Delta 2$, the time lag between the end of illumination T_f and recovery of the FDG uptake rate. These two delay parameters were extracted from the intersections of the equations fitted to the three steady-state parts of the tumor FDG-uptake curves. Combined with the variations in the FDG uptake rates, these parameters were found to be helpful in discriminating between direct or indirect action mechanisms and characterizing the tumor response during PDT.

Statistical analysis

The values reported represent the average \pm standard error of the mean over the number of subjects in each group. The significance of differences between the mean values was determined by the Student's t -test (p).

RESULTS

The experimental protocol used for this investigation is illustrated in Figure 2. Changes in the tumor FDG uptake are visible on the PET scans (60 sec each) taken during the 2-h real-time FDG-PET imaging sequence [Fig. 3]. The accumulation of FDG by the treated tumor drops significantly during the illumination period, followed by partial recovery upon termination of the light treatment.

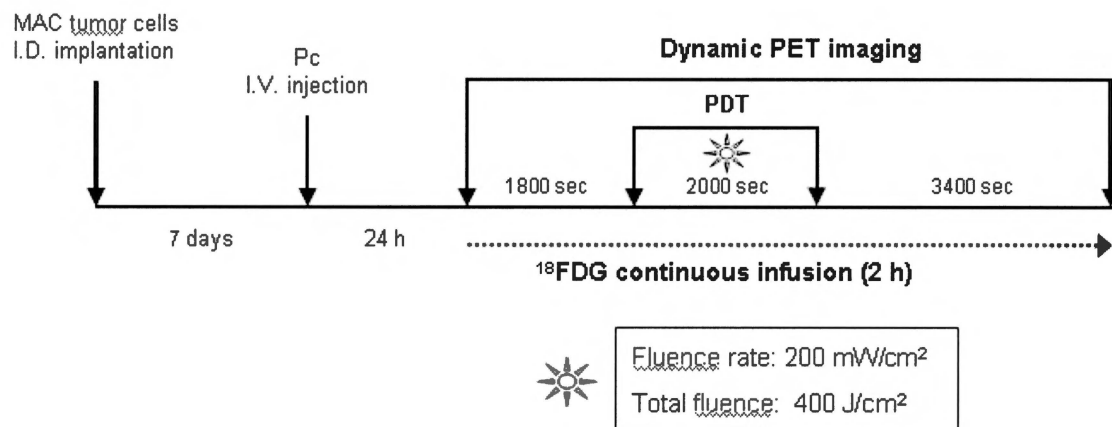


Figure 2 Schematic representation illustrating the different steps of the experimental PET-PDT protocol.

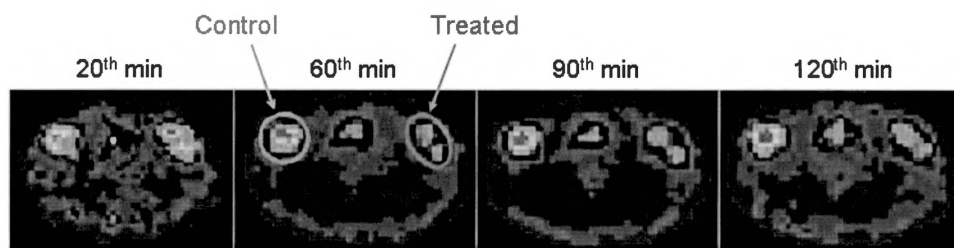


Figure 3 Selected FDG-PET image frames (1 min duration) taken at different times during the ZnPcS₂-PDT treatment.

While the FDG uptake is comparable in the two tumors before the onset of the PDT treatment (20 min), the uptake is significantly reduced at the end of the light treatment (60 min) in the treated tumor relative to control. Partial recovery of the FDG uptake is apparent after the treatment (90 min) and even more so at the end of the imaging sequence (120 min).

Differences in FDG uptake between the two PDT protocols are more clearly visible from the FDG time-activity curves taken over the non-treated and light-treated tumors [Figs. 4A and 4B]. Both ZnPcS₂- and AlPcS₄-PDT induce a drop in the FDG uptake-rate followed by a partial recovery some time after the end of the illumination period, but with different

response patterns. Both control scans, i.e. administered photosensitizer without light treatment or light treatment without photosensitizer, show a steady increase in the FDG uptake by both tumors (Figs. 4C and 4D). The differences observed in the base line FDG uptakes before PDT illumination are solely a result of the different tumor states at the time of the procedure.

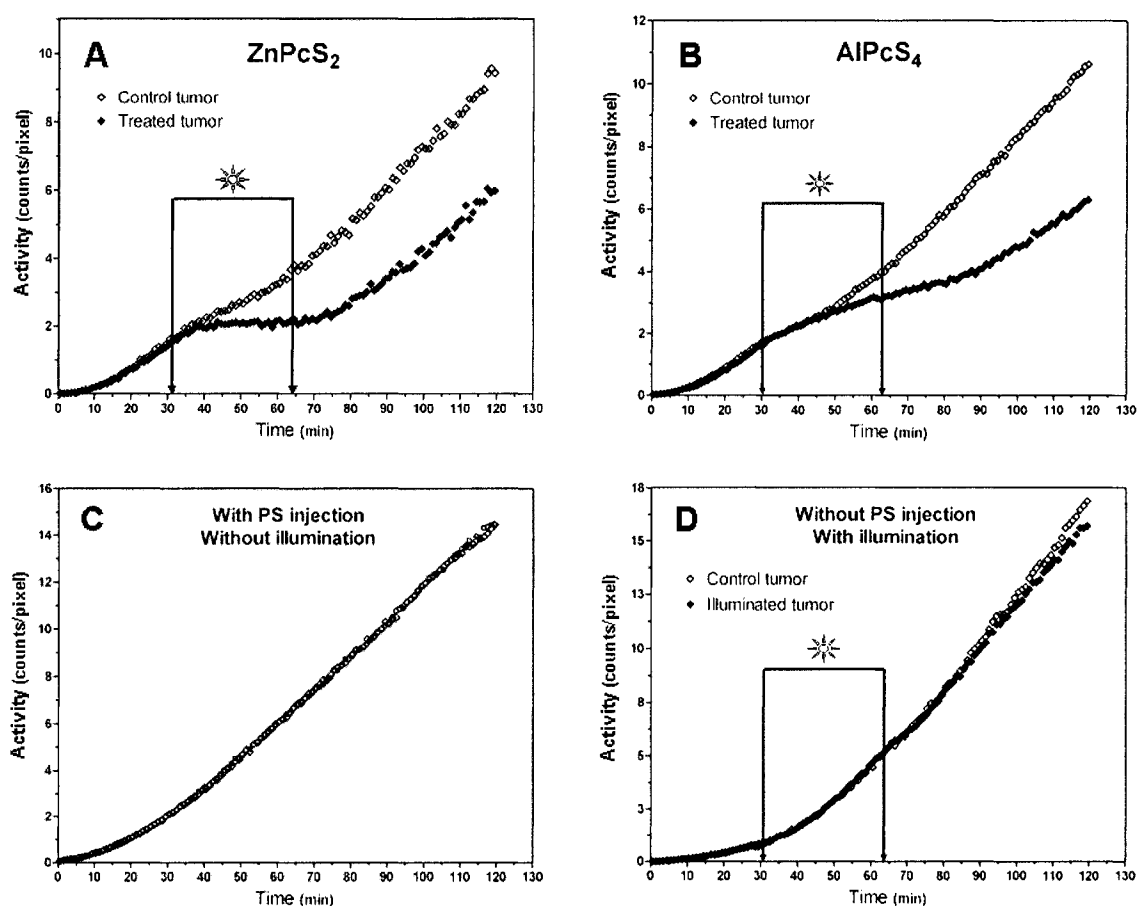


Figure 4 Typical FDG tumor uptake curves during a real-time FDG-PET study.

Animals were implanted with two tumors but only one tumor received light treatment. FDG uptake curves were generated for the treated and non-treated tumors during ZnPcS₂-PDT (A), AlPcS₄-PDT (B), control treatment with ZnPcS₂ without light (C), and control treatment without photosensitizer but with light treatment (D).

Analysis of the FDG time–activity curves, as depicted for ZnPcS₂-PDT in Figure 5, showed the 3 distinctly different steady phases— m_1 , m_2 , and m_3 —and 2 transient regions characterized by response delays— $\Delta 1$ and $\Delta 2$ —properly describe the FDG uptake rate. Combined, these parameters enabled clear discrimination between direct and indirect mechanisms of tumor cell kill but also provided some insight into the mechanisms of action of different drugs early during the photodynamic process.

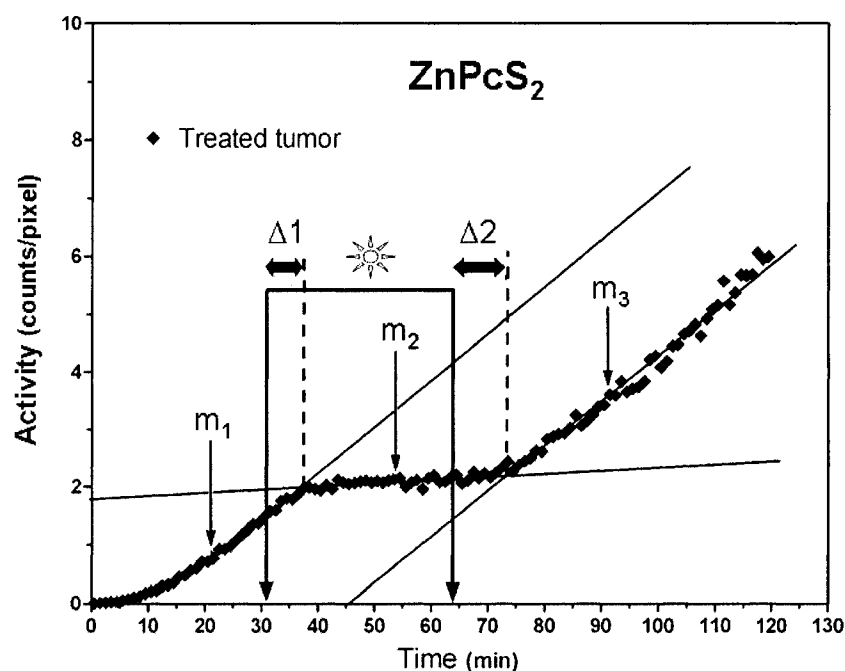


Figure 5 FDG tumor uptake curve during ZnPcS₂-PDT treatment depicting the three distinct FDG uptake phases as well as the 5 parameters used to describe the uptake slopes, the response delay ($\Delta 1$) and the recovery delay ($\Delta 2$) times.

The effect of the nature of the photosensitizer on the PDT tumor response is summarized by the average FDG uptake-rates [Fig. 6] and response-recovery delays [Fig. 7] of four independent experiments. In the case of ZnPcS₂-PDT, which induces substantially direct tumor cell kill, the rate drops dramatically (>90%) within 4 min after the start of the light treatment while recovering to about 80% of the initial rate within 10 min after terminating the treatment, as this is illustrated in Figure 6A for the FDG uptake-rates and Figure 7 for the response-recovery delays. The control tumor also shows a 50% drop in the FDG uptake-rate during PDT, followed by complete recovery after the treatment, suggesting a systemic response during the illumination phase (Fig. 6A). In the case of AlPcS₄-PDT, which largely acts via vascular stasis, this systemic component is small (<10% drop in FDG uptake-rate), although the FDG uptake-rate by the control tumor shows a slight but significant (~30%) increase after completing the light treatment (Fig. 6B). The FDG uptake-rate in the illuminated tumor with AlPcS₄-PDT drops by 70% (Fig. 6B) after a relative long response lag-time of nearly 10 min (Fig. 7). Even more significant is the long lag-time of almost 25 min after AlPcS₄-PDT (Fig. 7) before the FDG uptake-rate recovers to about 60% of the initial rate (Fig. 6B).

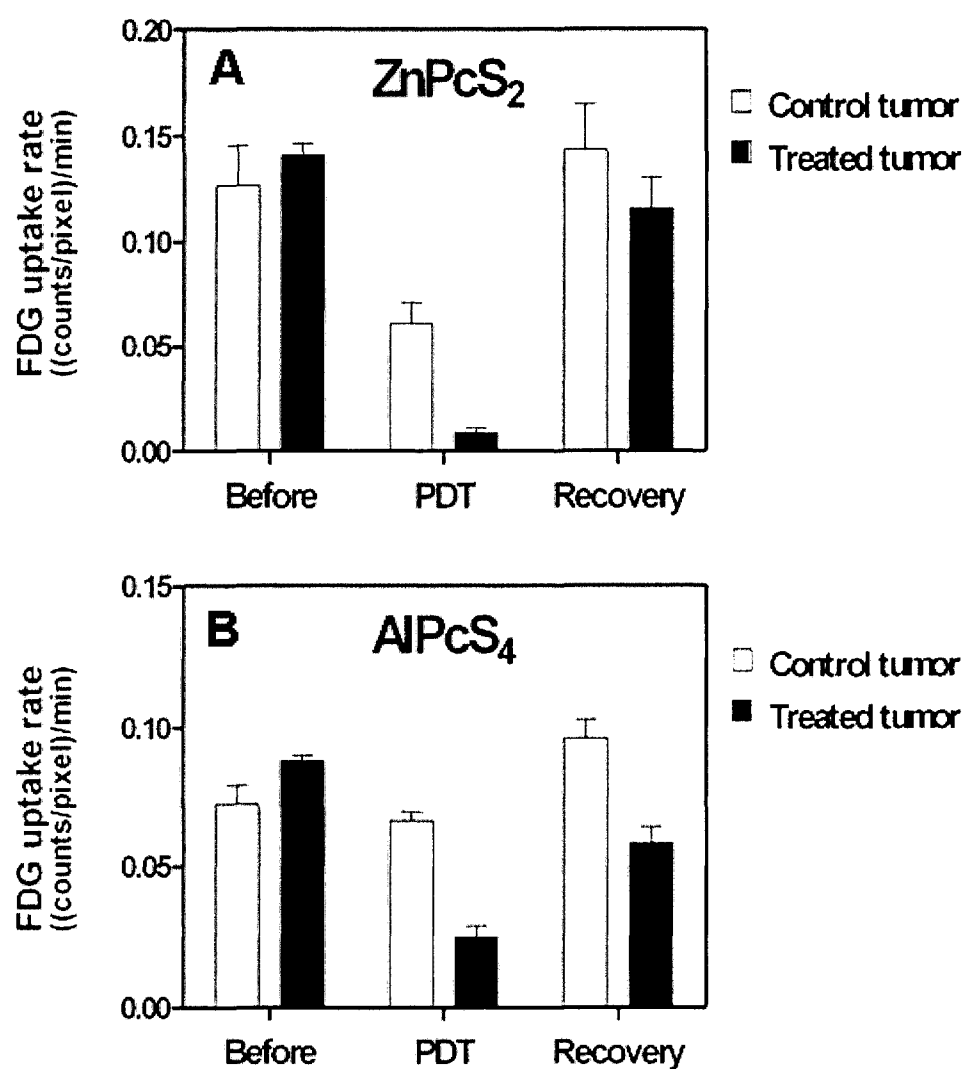


Figure 6 Histograms representing the mean (\pm SD) tumor FDG uptake-rates in (counts/pixel/min) before, during and after the illumination period.

Data were obtained from studies with ZnPcS₂-PDT (n=4) (A) and with AlPcS₄-PDT (n=4) (B).

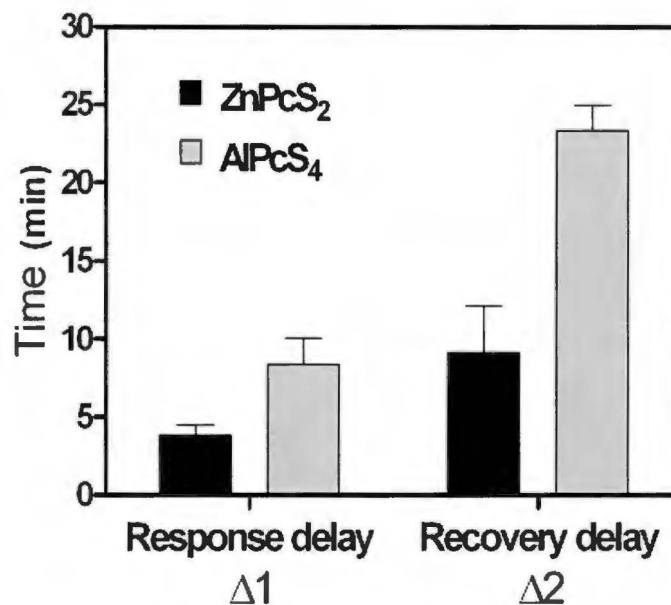


Figure 7 Histogram representing the mean (\pm SD) response-delay ($\Delta 1$) and recovery-delay ($\Delta 2$), in minutes.

Data were obtained from studies with ZnPcS₂-PDT (n=4) and with AlPcS₄-PDT (n=4).

DISCUSSION

Mechanisms of action

Photodynamic therapy requires three components: a photosensitizer, molecular oxygen and red light. Combined they generate singlet oxygen, which is believed to be the principal cytotoxic entity, resulting in localized oxidative stress (23). Due to the high reactivity of singlet oxygen, this species exerts its detrimental action at the site of photosensitizer retention. Thus the action mechanism by which PDT induces tumor cell death largely depends on the localization of the photosensitizer during light exposure. Chemical modifications that change the solubility of a photosensitizer without affecting its photochemical properties can significantly affect the outcome of PDT by modulating pharmacokinetics and tissue distribution. The photosensitizers selected for this study are

known to target different tumor components. The amphiphilic, disulfonated ZnPcS₂ has good cell membrane penetrating properties and targets sub-cellular membrane structures. Furthermore, binding to lipoproteins favors retention by tumor tissue through interaction with low-density lipoprotein (LDL) receptors that are over expressed at the cell membrane of most tumor cells (24-26). In contrast, the highly water-soluble, tetra substituted AlPcS₄ is transported by serum albumin resulting in accumulation within the interstitial space and vascular stroma of the tumor tissue (27). Thus, whereas ZnPcS₂ readily localizes in tumor cells after iv injection, AlPcS₄ remains in the tumor vascular compartment. The photosensitizer distribution pattern has obvious implications for the mechanisms by which PDT will induce tumor regression. PDT with ZnPcS₂ causes impairment of mitochondrial and other intra cellular membrane systems resulting in direct tumor cell kill, while PDT with AlPcS₄ induces damage to tumor blood vessels, interrupting the supply of oxygen and nutrients, resulting in indirect tumor cell death (28, 29). In addition, varying the interval between drug administration and light exposure will affect the localization of a selected photosensitizer and consequently the way it will act (30). For example, PDT with the amphiphilic AlPcS₂ resulted in severe vascular damage to a LOX tumor model when light was applied shortly after drug injection, while direct tumor cell damage was observed when the illumination was performed 48 hours after drug administration (31). The PDT protocol and photosensitizers used for this FDG-PET study were selected such that ZnPcS₂-PDT mainly induced direct tumor cell kill whereas AlPcS₄-PDT provoked vascular damage.

In our experiments, changes in the FDG uptake profiles by the treated tumors are more readily explained by the underlying action mechanisms. In the case of ZnPcS₂-PDT, direct PDT-induced damage to tumor cell membranes may result in loss of glucose transporter and/or hexokinase activity, both of which would result in a rapid reduction of FDG tumor uptake-rate. The FDG uptake-rate rapidly recovers to over 80% of the initial rate suggesting that most of the damage was reversible (Fig. 6A). However other factors may contribute to this resurgence. It is well known that apoptosis is a major response mechanism to the intracellular damage inflicted by PDT (32). Since the apoptotic pathway also requires energy (33), this could explain at least in part the increase in FDG uptake by the treated tumor. In addition, infiltration of inflammatory cells and the presence of residual viable tumor cells may also contribute to maintaining the FDG uptake-rate (34).

In the case of AlPcS₄-PDT, damage to the vascular system is reflected in the delayed drop in the FDG uptake-rate and the long recovery period of over 20 min after the illumination is terminated. The recovery delay-time is three times longer than that observed in the case of the direct cell kill mechanism (Fig. 7). Also, the recovered FDG uptake-rate remains substantially lower than the initial rate (Fig. 6B), suggesting that irreversible vascular damage limits the blood flow and FDG transport to the tumor tissue. Again, other factors including inflammatory cells infiltration and reversible damage may also contribute to the increase in the FDG uptake-rate.

Other investigations using alternate, more specific radiotracers which are not subjected to secondary confounding effects such as inflammation or apoptosis, would have to be

considered to unravel the processes at the origin of the observed resurgence in FDG tumor-uptake after PDT. We are currently investigating the feasibility of using the perfusion tracers $[^{13}\text{N}]\text{ammonia}$ ($^{13}\text{NH}_3$) and ^{64}Cu -labeled pyruvaldehyde bis(N4-methylthiosemicarbazone) (^{64}Cu -PTSM) to measure tumor blood flow during and after PDT. Promising new tracers such as $[^{18}\text{F}]\text{fluorothymidine}$ (FLT) (35) or $[^{18}\text{F}]\text{fluoroethyltyrosine}$ (FET) (36) could also be used with the same dynamic PET imaging protocol as FDG to measure the real-time variations in cell proliferation or protein synthesis during and after PDT. The observation period could likely be extended over a longer time with little modification to the protocol to determine the duration and extent of the transient metabolic processes after PDT.

Systemic response

Even when shielded from light, the control tumor in the ZnPcS_2 -PDT protocol showed reduced FDG uptake during the illumination phase, suggesting a systemic response originating from the treated tumor (Fig. 6A). In the case of the AlPcS_4 -PDT protocol, FDG uptake by the control tumor was only slightly affected during the illumination phase (Fig. 6B). However, its uptake rate increased significantly ($p < 0.05$) after PDT, suggestive of augmented metabolic activity. Hence, the control tumors in both cases show variations in FDG uptake resulting from the illumination phase, suggesting a systemic response originating from the treated tumors. Any uncorrelated effect of the photosensitizer or light treatment alone can be discarded, as confirmed by the control scans without light treatment and without photosensitizer (Figs. 4C and 4D). The systemic response likely results from the release of signaling factors at the site of the treated tumor. It is well known that damage

to the vascular endothelium or platelets leads to the production of various vasoactive compounds including eicosanoids such as thromboxane, cytokines, clotting factors, and histamine. This in turn leads to increased vascular permeability to macromolecules, vessel constriction and eventually blood flow stasis (37,38). Thus although the release of these vasoactive factors occurs at the site of illumination, they may enter the blood circulation to act on remote blood vessels including those of the control tumor, causing vasoconstriction and the observed drop in FDG uptake by the distant tumor.

Although this series of events has been shown to occur with photosensitizers localizing in the vascular stroma of tumors, i.e. those acting via an indirect mechanism, photosensitizers acting directly on tumor cells may likewise results in a similar effect. For instance PDT of hamster ovary cells in vitro resulted in loss of cell integrity and the release of inflammatory and immune mediators, including eicosanoids and histamine (39). Therefore, both AlPcS₄- or ZnPcS₂-PDT induced release of vasoactive molecules may explain, at least in part, the decrease in FDG uptake by the illuminated as well as control tumor. If indeed circulating vasoactive mediators affect the control tumor, this systemic effect will likely induce subtle changes in the vascular system of other organs. To this end, PET imaging of possible alternative target organs, such as the heart, could be attempted to reveal the existence of a systemic vasoconstriction effect induced by localized photodynamic activity.

Pharmacokinetic modeling

The aim of this study was to demonstrate the feasibility of real-time imaging of transient metabolic processes during PDT. As such, quantitative modeling of the FDG uptake was

not attempted in these pilot studies. The continuous infusion protocol was designed in the first place to circumvent the limitations of multiple bolus injection of FDG, as previously used to follow PDT kinetics (17). Deriving quantitative values from the observed changes in perfusion and metabolic activities will require the design and validation of a proper kinetic model, which will be addressed in future studies.

Future perspectives

Even though these real-time FDG-PET studies leave many questions on the complex PDT tumor response mechanisms unanswered, the dissimilar transient metabolic processes revealed by changes in the FDG uptake-rates and response delay-times are striking evidence of different modes of action. The dramatic differences in the FDG uptake profiles provide a rapid, real-time measure to distinguish between direct and indirect tumor cell destruction mechanisms, and to assist in characterizing the photosensitizer and the PDT protocol. This is in sharp contrast with conventional, visual tumor response follow-up procedures that usually require many weeks of observation (40). Obviously FDG-PET can also be used to follow tumor regression after PDT at later time intervals (17). However the clear advantage of continuous FDG infusion and dynamic PET imaging over other tumor response assessment modalities lies in its potential to visualize tumor response in real-time, enabling the sequence of subtle transient metabolic processes to be observed over time as they take place within the tumor tissues. In addition to identifying differences in action mechanisms between various drugs, this technique also allows for the rapid assessment of PDT protocols in terms of optimizing drug/light doses and timing between their applications. Further studies to expand real-time PET monitoring of tumor response to PDT by including

radiotracers for blood flow, cell proliferation, hypoxia and apoptosis are in progress in our laboratory. The same method could be considered to investigate the early response of tumors to other therapeutical approaches, such as chemotherapy or radiotherapy.

CONCLUSION

We have demonstrated the feasibility of continuous FDG infusion and dynamic PET imaging to study tumor metabolic response in real-time during photodynamic therapy in a small-animal model. This real-time approach proved to be particularly useful for investigating the tumoral and systemic transient metabolic changes resulting from the application of PDT treatment and for characterizing the mechanisms of action of different photosensitizing drugs. Such dynamic small-animal PET imaging can also be used as a rapid screening procedure for selecting new drugs and for optimizing treatment protocols. Since tumor response to photodynamic therapy involves both a metabolic and vaso-restrictive component, we are currently expanding the procedure by including a blood-flow PET tracer in our PET-PDT studies. The concept of dynamic PET imaging combined with a constant radiotracer infusion that has been demonstrated here can be applied to the real-time monitoring of other transient cellular and molecular processes, such as cell proliferation, protein synthesis, hypoxia and apoptosis during and immediately following therapeutic intervention.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by the Canadian Institutes of Health Research (CIHR grants MOP-44065 and MOP-15348). The authors would like to acknowledge the contribution of David Lapointe who originally suggested the continuous infusion method used in this work to monitor tumor metabolic response in real time during PDT.

REFERENCES

1. Dougherty TJ. Photosensitizers: therapy and detection of malignant tumors. *Photochem Photobiol.* 1987;45:879-889.
2. Henderson BW, Dougherty TJ. How does photodynamic therapy work? *Photochem Photobiol.* 1992;55:145-157.
3. Dougherty TJ, Marcus SL. Photodynamic therapy. *Eur J Cancer.* 1992;28A:1734-1742.
4. Sharman WM, Allen CM, van Lier JE. Photodynamic therapeutics: basic principles and clinical applications. *Drug Discov Today.* 1999;4:507-517.
5. Allen CM, Sharman WM, van Lier JE. Current status of phthalocyanines in the photodynamic therapy of cancer. *J Porph Phthal.* 2001;5:161-169.
6. Oleinick NL, Evans HH. The photobiology of photodynamic therapy: cellular targets and mechanisms. *Radiat Res.* 1998;150:S146-156.
7. Krammer B. Vascular effects of photodynamic therapy. *Anticancer Res.* 2001;21:4271-4277.
8. Jori G. In vivo transport and pharmacokinetic behavior of tumour photosensitizers. *CIBA Found Symp.* 1989;146:78-86; discussion 86-94.
9. Chan WS, Brasseur N, La Madeleine C, Ouellet R, van Lier JE. Efficacy and mechanism of aluminium phthalocyanine and its sulphonated derivatives mediated photodynamic therapy on murine tumours. *Eur J Cancer.* 1997;33:1855-1859.
10. Chan WS, Brasseur N, La Madeleine C, van Lier JE. Evidence for different mechanisms of EMT-6 tumor necrosis by photodynamic therapy with disulfonated aluminum phthalocyanine or photofrin: tumor cell survival and blood flow. *Anticancer Res.* 1996;16:1887-1892.
11. Cherry SR, Gambhir SS. Use of positron emission tomography in animal research. *ILAR J.* 2001;42:219-232.
12. Herschman HR. Micro-PET imaging and small animal models of disease. *Curr Opin Immunol.* 2003;15:378-384.
13. Myers R. The biological application of small animal PET imaging. *Nucl Med Biol.* 2001;28:585-593.
14. West CM, Jones T, Price P. The potential of positron-emission tomography to study anticancer-drug resistance. *Nat Rev Cancer.* 2004;4:457-469.
15. Chaiken L, Rege S, Hoh C, et al. Positron emission tomography with fluorodeoxyglucose to evaluate tumor response and control after radiation-therapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 1993;27:455-464.

16. Tatsumi M, Nakamoto Y, Traughber B, Marshall LT, Geschwind JFH, Wahl RL. Initial experience in small animal tumor imaging with a clinical positron emission tomography/computed tomography scanner using 2-[F-18]fluoro-2-deoxy-D-glucose. *Cancer Res.* 2003;63:6252-6257.
17. Lapointe D, Brasseur N, Cadorette J, et al. High-resolution PET imaging for in vivo monitoring of tumor response after photodynamic therapy in mice. *J Nucl Med.* 1999;40:876-882.
18. Moore JV, Waller ML, Zhao S, et al. Feasibility of imaging photodynamic injury to tumours by high-resolution positron emission tomography. *Eur J Nucl Med.* 1998;25:1248-1254.
19. Bentourkia M, Bérard V, Cadorette J, van Lier JE, Lecomte R. Assessment of tumor photodynamic therapy in the rat using small animal positron emission tomography [abstract]. *Mol Imag Biol.* 2004;6:92.
20. Ali H, Langlois R, Wagner JR, Brasseur N, Paquette B, van Lier JE. Biological activities of phthalocyanines .10. Syntheses and analyses of sulfonated phthalocyanines. *Photochem Photobiol.* 1988;47:713-717.
21. Lecomte R, Cadorette J, Rodrigue S, et al. Initial results from the Sherbrooke avalanche photodiode positron tomograph. *IEEE Trans Nucl Sci.* 1996;43:1952-1957.
22. Selivanov VV, Picard Y, Cadorette J, Rodrigue S, Lecomte R. Detector response models for statistical iterative image reconstruction in high resolution PET. *IEEE Trans Nucl Sci.* 2000;47:1168-1175.
23. Sharman WM, Allen CM, van Lier JE. Role of activated oxygen species in photodynamic therapy. *Methods Enzymol.* 2000;319:376-400.
24. Gèze M, Morlière P, Mazière JC, Smith KM, Santus R. Lysosomes, a key target of hydrophobic photosensitizers proposed for photochemotherapeutic applications. *J Photochem Photobiol B.* 1993;20:23-35.
25. Jori G, Beltramini M, Reddi E, et al. Evidence for a major role of plasma lipoproteins as hematoporphyrin carriers in vivo. *Cancer Lett.* 1984;24:291-297.
26. Mazière JC, Morlière P, Santus R. The role of the low density lipoprotein receptor pathway in the delivery of lipophilic photosensitizers in the photodynamic therapy of tumours. *J Photochem Photobiol. B.* 1991;8:351-360.
27. Kessel D, Thompson P, Saatio K, Nantwi KD. Tumor-localization and photosensitization by sulfonated derivatives of tetraphenylporphine. *Photochem Photobiol.* 1987;45:787-790.
28. Milanesi C, Zhou C, Biolo R, Jori G. Zn(II)-phthalocyanine as a photodynamic agent for tumours. II. Studies on the mechanism of photosensitised tumour necrosis. *Br J Cancer.* 1990;61:846-850.

29. van Lier JE, Spikes JD. The chemistry, photophysics and photosensitizing properties of phthalocyanines. *CIBA Found Symp.* 1989;146:17-32.
30. Peng Q, Moan J, Nesland JM. Correlation of subcellular and intratumoral photosensitizer localization with ultrastructural features after photodynamic therapy. *Ultrastruct Pathol.* 1996;20:109-129.
31. Peng Q, Moan J, Nesland JM, Rimington C. Aluminum phthalocyanines with asymmetrical lower sulfonation and with symmetrical higher sulfonation: a comparison of localizing and photosensitizing mechanism in human tumor LOX xenografts. *Int J Cancer.* 1990;46:719-726.
32. Oleinick NL, Morris RL, Belichenko I. The role of apoptosis in response to photodynamic therapy: what, where, why, and how. *Photochem Photobiol Sci.* 2002;1:1-21.
33. Oberdanner CB, Kiesslich T, Krammer B, Plaetzer K. Glucose is required to maintain high ATP-levels for the energy-utilizing steps during PDT-induced apoptosis. *Photochem Photobiol.* 2002;76:695-703.
34. Findlay M, Young H, Cunningham D, et al. Noninvasive monitoring of tumor metabolism using fluorodeoxyglucose and positron emission tomography in colorectal cancer liver metastases: correlation with tumor response to fluorouracil. *J Clin Oncol.* 1996;14:700-708.
35. Sugiyama M, Sakahara H, Sato K, et al. Evaluation of 3'-deoxy-3'-¹⁸F-fluorothymidine for monitoring tumor response to radiotherapy and photodynamic therapy in mice. *J Nucl Med.* 2004;45:1754-1758.
36. Pauleit D, Stoffels G, Schaden W, et al. PET with O-(2-¹⁸F-Fluoroethyl)-L-Tyrosine in peripheral tumors: first clinical results. *J Nucl Med.* 2005;46:411-416.
37. Ben-Hur E, Heldman E, Crane SW, Rosenthal I. Release of clotting factors from photosensitized endothelial cells: a possible trigger for blood vessel occlusion by photodynamic therapy. *FEBS Lett.* 1988;236:105-108.
38. Fingar VH. Vascular effects of photodynamic therapy. *J Clin Laser Med Surg.* 1996;14:323-328.
39. Bellnier DA, Dougherty TJ. Membrane lysis in Chinese hamster ovary cells treated with hematoporphyrin derivative plus light. *Photochem Photobiol.* 1982;36:43-47.
40. Margaron P, Madarnas P, Ouellet R, van Lier JE. Biological activities of phthalocyanines. XVII histopathologic evidence for different mechanisms of EMT-6 tumor necrosis induced by photodynamic therapy with disulfonated aluminum phthalocyanine or photofrin. *Anticancer Res.* 1996;16:613-620.

3 - Imagerie TEP en temps réel du flot sanguin tumoral lors de la TPD

D'autres investigateurs ont déjà observé, par d'autres méthodes que l'imagerie TEP, des changements dans le flot sanguin tumoral induits par la thérapie photodynamique. Ces observations ont été réalisées grâce à l'emploi de différentes techniques comme des chambres d'observation (STAR et al., 1986), des coupes histologiques (NELSON et al., 1988), le comptage de la radioactivité présente dans des tumeurs suite à l'injection de l'agent de perfusion ^{99m}Tc -MIBI (BRASSEUR et al., 1996), ou d'autres méthodes utilisant la microscopie *in vivo* ou un appareil Doppler à ultrasons (POGUE et al., 2001; REED et al., 1989). Ces méthodes, pour la plupart invasives, ont permis d'observer les effets de la TPD sur la perfusion tumorale, aidant à mettre en évidence et à mieux comprendre le mécanisme d'action indirect de cette thérapie. L'utilisation de techniques non-invasives pour imager *in vivo* le flot sanguin revêt par contre une grande importance dans la recherche biomédicale et lors de diagnostics cliniques. Récemment, Yu et al. (YU et al., 2005) ont utilisé la spectroscopie par corrélation diffuse (DCS) afin de mesurer le flot sanguin dans des fibrosarcomes de souris de façon continue durant et après la TPD avec la Photofrin®. Le flot sanguin relatif, c'est-à-dire normalisé par rapport aux valeurs avant l'illumination, corrélait avec les valeurs de perfusion tumorale obtenues avec un appareil Doppler à ultrasons, montrant tous deux en temps réel les changements dans le flot sanguin tumoral (Figure 10).

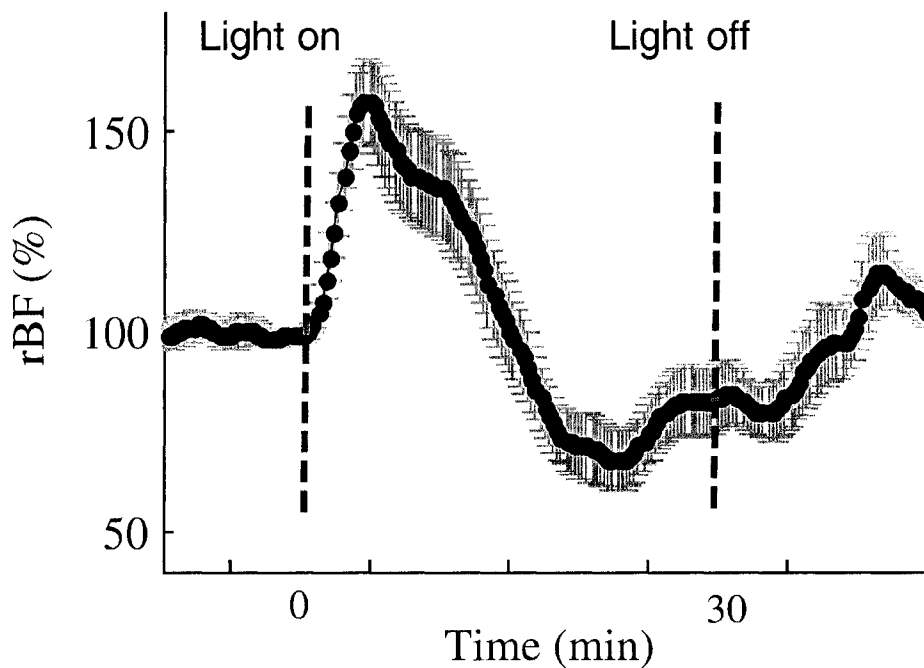


Figure 10 - Représentation des changements relatifs dans le flot sanguin tumoral avant, pendant et après la TPD chez une souris par spectroscopie DCS

Image provenant de Yu et al., 2005.

L'augmentation initiale rapide du flot sanguin observée au début de l'illumination peut être due à un phénomène d'auto-régulation du tissu. En effet, quand le traitement commence l'oxygène est consommée en grande quantité par le processus photochimique de la TPD. Le tissu tumoral tente probablement de pallier à cette demande à la hausse en oxygène en amenant plus de sang oxygéné via une augmentation du flot sanguin. D'autres ont aussi observé ce même phénomène, c'est-à-dire une diminution dans le flot sanguin tumoral chez des rongeurs sous traitement photodynamique mais précédée d'une légère hausse très tôt après le début de l'illumination (WIEMAN et al., 1988). La diminution du flot sanguin montre bien quant à elle l'occlusion temporaire des vaisseaux induite par la TPD avec la Photofrin® comme d'autres groupes (POGUE et al., 2001; REED et al., 1989) l'ont aussi

montré avec d'autres photosensibilisateurs agissant aussi sur la vascularisation. Il est à noter que chez les souris contrôles ne recevant que la lumière sans le photosensibilisateur, aucun changement significatif n'a été mesuré dans le flot sanguin tumoral durant ou après la TPD. Comme mentionné précédemment, le photosensibilisateur AlPcS₄ que nous avons utilisé endommage principalement les vaisseaux sanguins tumoraux, d'après son mode d'action connu de type indirect. Cet agent, tout comme d'autres agents anti-angiogéniques, diminue donc le flot sanguin de la tumeur et subséquemment son métabolisme (LI, 2000). Les résultats présentés dans l'article 2 portant sur « l'imagerie dynamique des processus métaboliques transitoires à l'aide de la TEP dans l'évaluation de photosensibilisateurs pour la TPD » montrent effectivement une chute de métabolisme chez la tumeur traitée durant la TPD, précédée d'un long délai de réponse et suivie d'une reprise de captation partielle et lente du [¹⁸F]-FDG avec l'emploi du photosensibilisateur AlPcS₄. De façon hypothétique, ces observations sont attribuées à l'avènement d'une stase vasculaire, donc une diminution du flot sanguin tumoral qui réduit ainsi l'apport d'oxygène et de nutriments comme le glucose jusqu'aux cellules tumorales. Alors en utilisant l'imagerie TEP, versus les autres techniques mentionnées précédemment, nous avons voulu vérifier s'il était possible d'observer une diminution du flot sanguin tumoral reflétant le début d'une stase vasculaire suite à l'application de la thérapie photodynamique avec le photosensibilisateur AlPcS₄. Pour ce faire nous avons employé notre même protocole d'imagerie TEP en temps réel chez le rat, mais avec des radiotraceurs qui mesurent la perfusion sanguine, tels que le [¹³N]-NH₃ et le [⁶⁴Cu]-PTSM (BABICH et al., 1989; MATHIAS et al., 1994), afin de pouvoir déceler d'éventuelles variations dans le flot sanguin tumoral.

3.1 - Matériels et méthodes

Afin de pouvoir déceler chez le rat d'éventuelles variations dans le flot sanguin tumoral induites par la TPD, le même protocole d'imagerie TEP en temps réel que celui pour l'étude du métabolisme tumoral a été employé, mais avec les radiotraceurs [^{13}N]- NH_3 et [^{64}Cu]-PTSM. Il est à noter que des études préliminaires de biodistribution et d'élimination sanguine ont aussi été réalisées avec le traceur [^{64}Cu]-PTSM.

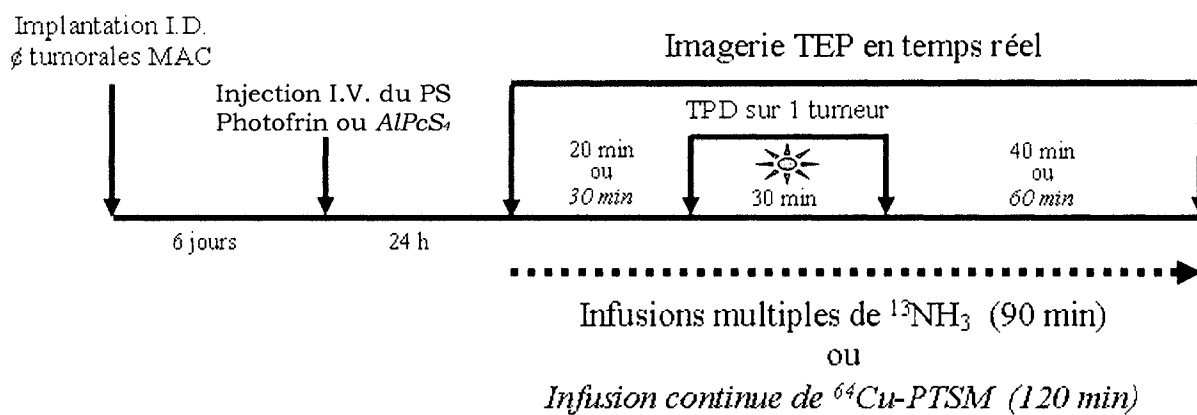


Figure 11 - Étapes du protocole expérimental menant à l'imagerie TEP en temps réel du flot sanguin tumoral lors de la TPD

3.2 - Résultats

Les résultats obtenus suite à ces études préliminaires sont donc présentés ci-dessous pour chacun des traceurs de perfusion sanguine utilisés.

3.2.1 - [^{13}N]- NH_3

Nous avons tout d'abord employé le radiotracer [^{13}N]- NH_3 possédant une demi-vie de 10 minutes. La Figure 12 illustre une étude d'imagerie TEP en temps réel avec le [^{13}N]- NH_3

injecté en continu à 2 reprises avec la TPD faite avec le photosensibilisateur Photofrin®. Le protocole expérimental d'imagerie utilisé se retrouve à l'annexe 2.

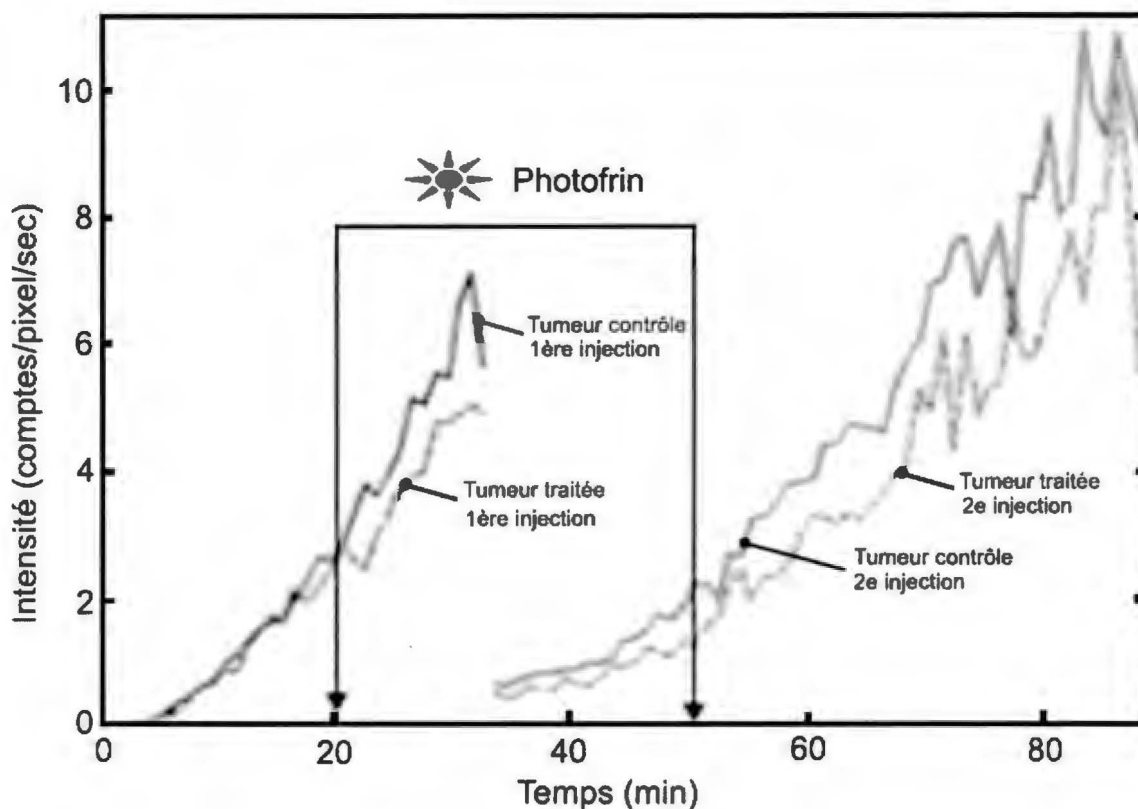


Figure 12 - Imagerie TEP en temps réel avec le $[^{13}\text{N}]\text{-NH}_3$ injecté en continu à 2 reprises; TPD faite avec le photosensibilisateur Photofrin®

3.2.2 - $[^{64}\text{Cu}]\text{-PTSM}$

Avant de procéder aux études d'imagerie tumorale en temps réel avec le $[^{64}\text{Cu}]\text{-PTSM}$ (Figure 15), nous avons fait des études de biodistribution chez des rats portant des tumeurs MAC afin d'observer dans quelles proportions se loge ce radiotraceur dans chacun des organes ainsi que dans les tumeurs. La Figure 13 illustre une biodistribution faite par la

dissection d'un rat ayant reçu une infusion de $[^{64}\text{Cu}]\text{-PTSM}$ en continu pendant 2 heures. Les données concernant le poids des rats, la dimension des tumeurs, la dose et le volume injecté, le débit de l'infusion, etc. sont les mêmes que celles inscrites à l'Annexe 3. Au niveau de la biodistribution par dissection, le sang, les tumeurs et les différents organes ont été prélevés de l'animal et pesés 2 heures suite à l'injection en continu du radiotraceur par la veine caudale. Leur contenu en radioactivité a ensuite été déterminé à l'aide d'un compteur à scintillation gamma et exprimé sous forme de ratio tissu/sang en cpm/g.

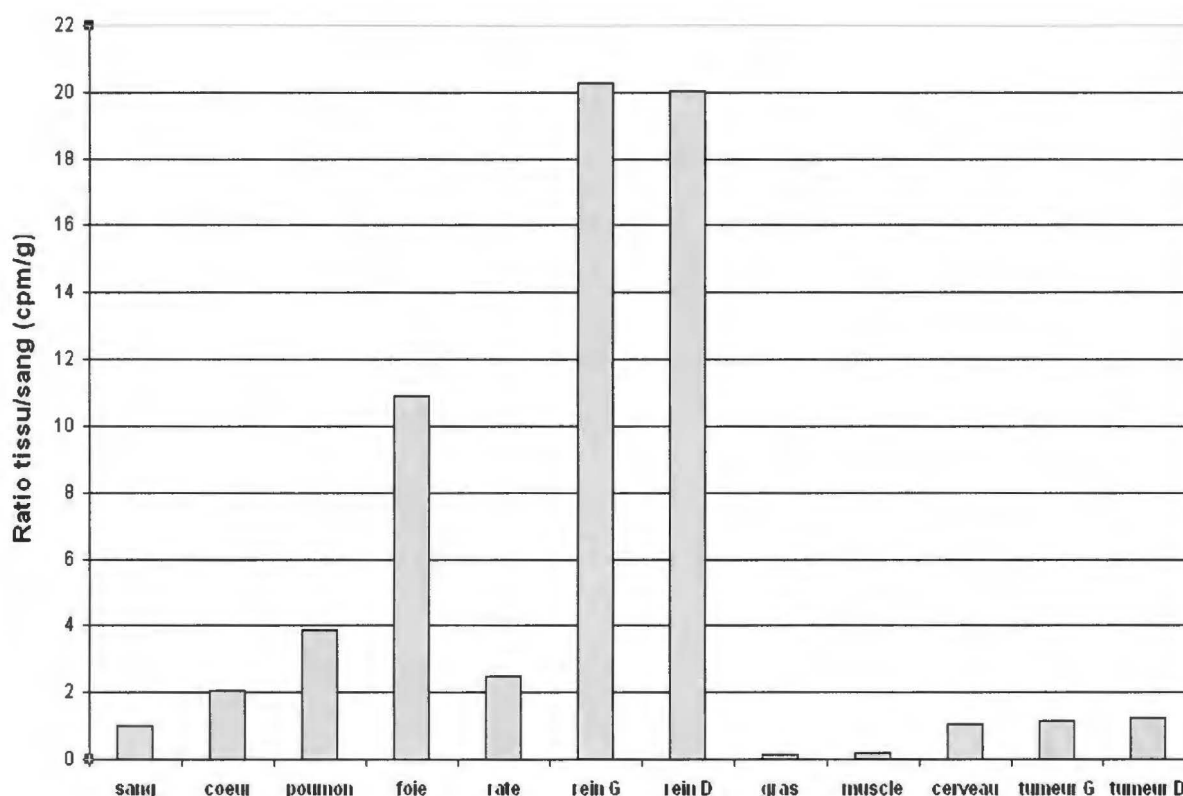


Figure 13 - Biodistribution du $[^{64}\text{Cu}]\text{-PTSM}$ faite par dissection d'un rat suite à une infusion en continu de 2 heures

La Figure 14 rapporte quant à elle les résultats de quelques biodistributions faites par imagerie TEP 2 heures suite à l'injection du [^{64}Cu]-PTSM sous forme de bolus. Les données concernant le poids des rats et la dimension des tumeurs sont les mêmes que celles inscrites à l'Annexe 3, alors que les paramètres d'injection diffèrent puisqu'il s'agissait d'une injection rapide sous forme de bolus (dose de 6 mCi dans un volume de 0,5 ml). La biodistribution ayant été réalisée par imagerie TEP et non par dissection, moins d'organes ont été analysés et leur contenu en radioactivité a été déterminé suite au tracé de régions d'intérêt et exprimé en % de la dose injectée par ml.

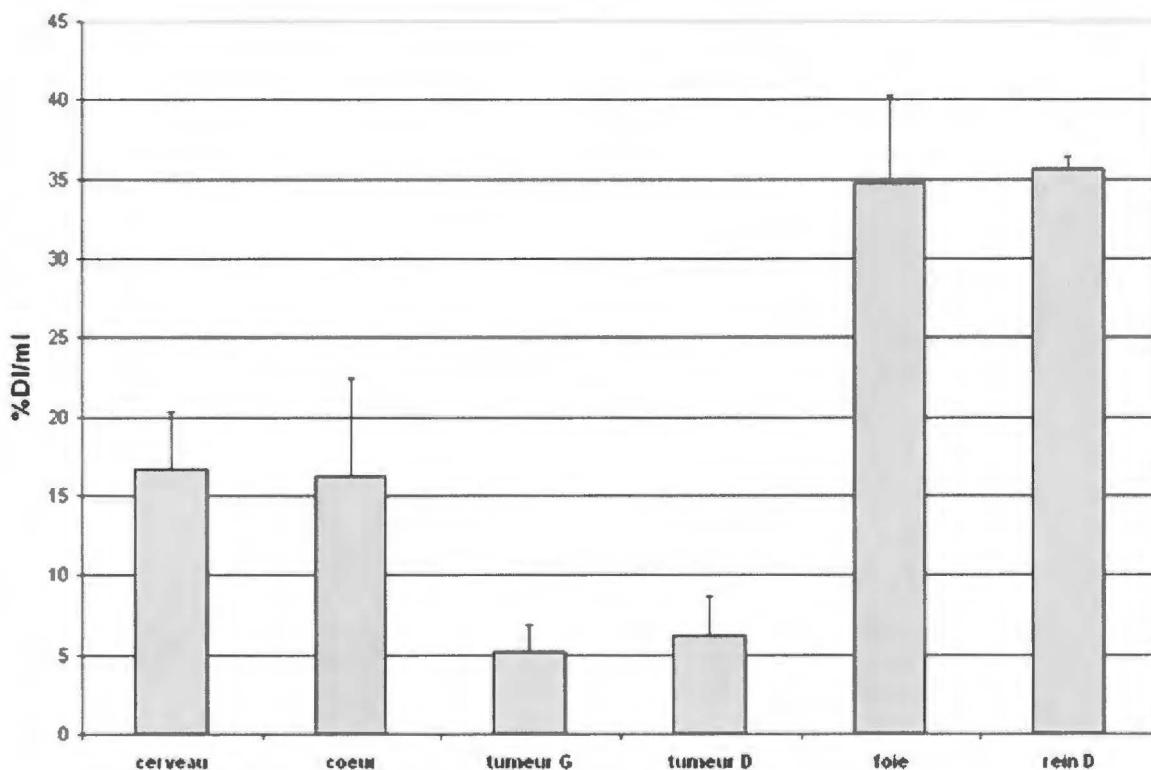


Figure 14 - Biodistributions du [^{64}Cu]-PTSM faites par imagerie TEP chez des rats 2 heures suite à une injection sous forme de bolus

Alors malgré l'observation d'une faible captation du radiotracer [^{64}Cu]-PTSM chez les tumeurs MAC lors des biodistributions, nous avons tout de même procédé à l'imagerie TEP en temps réel en utilisant presque le même protocole qu'avec le [^{18}F]-FDG, afin de vérifier s'il était possible d'observer une diminution du flot sanguin tumoral reflétant le début d'une stase vasculaire, suite à l'application de la thérapie photodynamique avec le photosensibilisateur AlPcS₄ (Figure 15; Annexe 3).

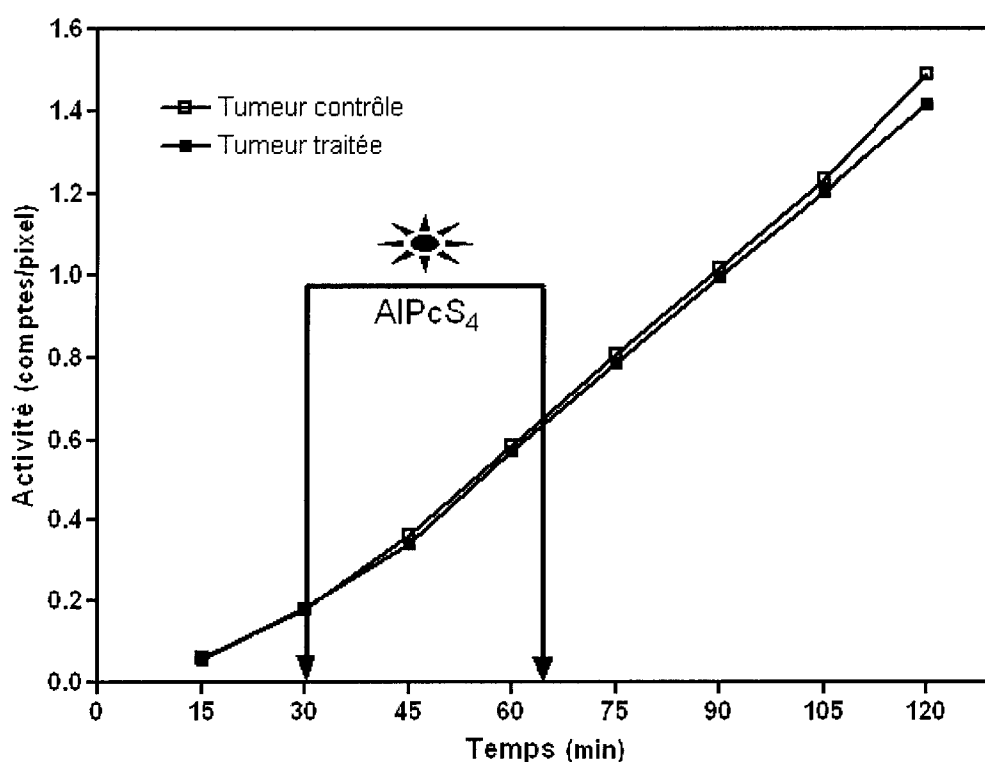


Figure 15 - Imagerie TEP en temps réel avec le [^{64}Cu]-PTSM injecté en continu pendant 2 heures; TPD faite avec le photosensibilisateur AlPcS₄

Finalement, à l'aide d'un échantillonneur sanguin et d'un compteur lui étant relié, nous avons réalisé des études sur l'élimination sanguine du radiotracer [^{64}Cu]-PTSM injecté de

façon continue dans l'animal pendant 2 heures (Figure 16). Chaque rat d'environ 140g recevait une infusion de $[^{64}\text{Cu}]$ -PTSM par la veine caudale (dose de 4 mCi dans un volume de 1 ml; débit de 0,008 ml/min) et il y avait une extraction simultanée du sang via la veine fémorale à l'aide d'un échantillonneur sanguin réglé à un débit de 0,037 ml/min.

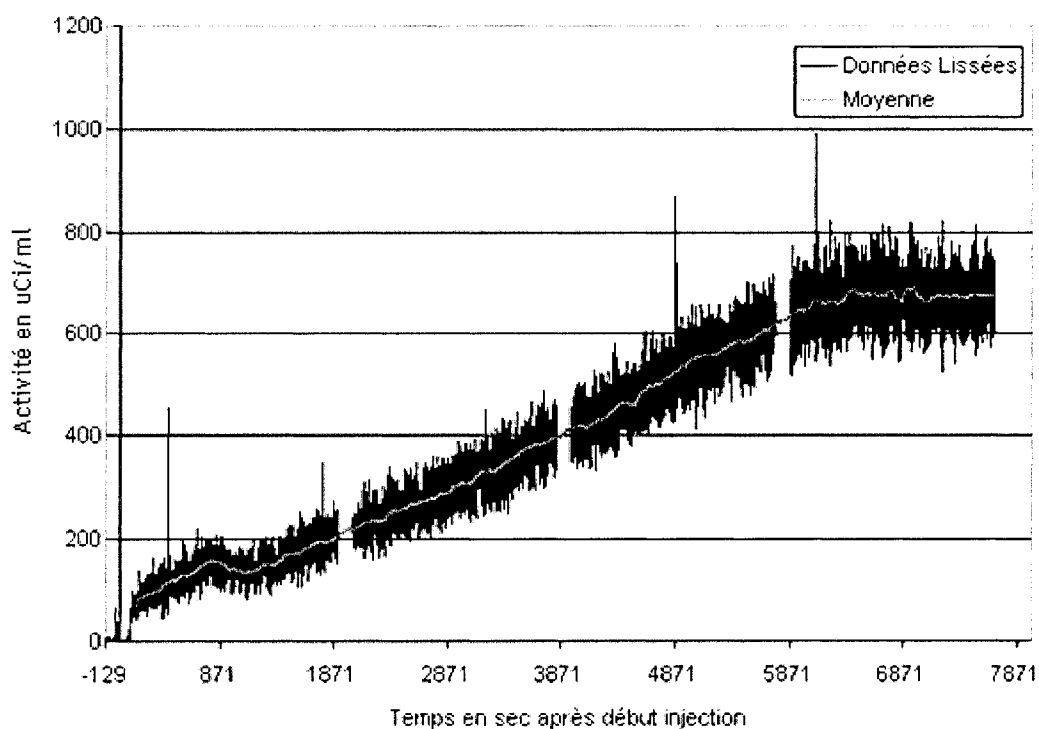


Figure 16 - Mesure de l'élimination sanguine du $[^{64}\text{Cu}]$ -PTSM injecté en continu pendant 2 heures à l'aide d'un compteur sanguin microvolumétrique

3.3 - Discussion

3.3.1 - [^{13}N]- NH_3

Les traceurs usuels comme l'ammoniac ($[^{13}\text{N}]\text{-NH}_3$) et l'eau ($[^{15}\text{O}]\text{-H}_2\text{O}$) radiomarqués peuvent être utilisés pour évaluer la perfusion des tissus tumoraux (LECOMTE et al., 2002). La demi-vie de l' ^{15}O étant seulement que de 2 minutes, son utilisation s'avérait par contre beaucoup trop complexe dans le cadre d'un protocole en temps réel requérant une injection continue du radiotracer pendant 120 minutes. Nous avons donc tout d'abord essayé le $[^{13}\text{N}]\text{-NH}_3$ ayant quant à lui une demi-vie de 10 minutes. La Figure 12 illustre une étude d'imagerie TEP en temps réel avec le $[^{13}\text{N}]\text{-NH}_3$ injecté en continu à 2 reprises avec la TPD faite avec le photosensibilisateur Photofrin[®]. La courte demi-vie de l'isotope ^{13}N a rendu difficile le suivi du flot sanguin sur une période dépassant 30 à 40 minutes. Des infusions multiples de $[^{13}\text{N}]\text{-NH}_3$ peuvent être effectuées pour prolonger la période d'imagerie, au dépit d'un protocole expérimental alourdi ainsi que d'une analyse des données plus complexe. C'est pourquoi un radiotracer alternatif ayant une plus longue demi-vie a été expérimenté par la suite pour ces études en temps réel. En effet, les traceurs TEP incorporant des radioisotopes de plus longue demi-vie, comme le $[^{18}\text{F}]\text{-FDG}$ et le $[^{64}\text{Cu}]\text{-PTSM}$ facilitent l'étude de processus biologiques sur plusieurs heures.

3.3.2 - [^{64}Cu]-PTSM

Avant de procéder aux études d'imagerie tumorale en temps réel avec le $[^{64}\text{Cu}]\text{-PTSM}$, nous avons fait des études de biodistribution chez des rats portant des tumeurs MAC afin de voir dans quelles proportions se loge ce radiotracer dans chacun des organes ainsi que dans les

tumeurs. La Figure 13 illustre une biodistribution faite par la dissection d'un rat ayant reçu une infusion de [^{64}Cu]-PTSM en continu pendant 2 heures, alors que la Figure 14 rapporte les résultats de quelques biodistributions faites par imagerie TEP 2 heures suite à l'injection du [^{64}Cu]-PTSM sous forme de bolus. On y remarque que la captation tumorale du [^{64}Cu]-PTSM est peu élevée comparativement à celle dans le cerveau, le cœur, le foie et les reins, des organes bien perfusés chez qui la captation considérable de [Cu]-PTSM a fait l'objet d'études mentionnées antérieurement (MATHIAS et al., 1990; SHELTON et al., 1989; SHELTON et al., 1990; WALLHAUS et al., 1998).

De plus, plusieurs études menées par Blower et al. (BLOWER et al., 1996) sur la biodistribution du [Cu]-PTSM ont révélé que cette molécule lipophile est métabolisée par le foie et excrétée par les voies hépatique et rénale. Des études faites par Adonai et al. (ADONAI et al., 2002) ont aussi montré la prédominance d'une élimination hépatique à l'aide de l'imagerie TEP 6 min et 20 h après injection I.V. de [^{64}Cu]-PTSM chez des souris (Figure 17). Une captation rénale de ce radiotraceur est aussi visible. Les résultats obtenus suite à des biodistributions par dissection corroborent leurs résultats obtenus par imagerie TEP.

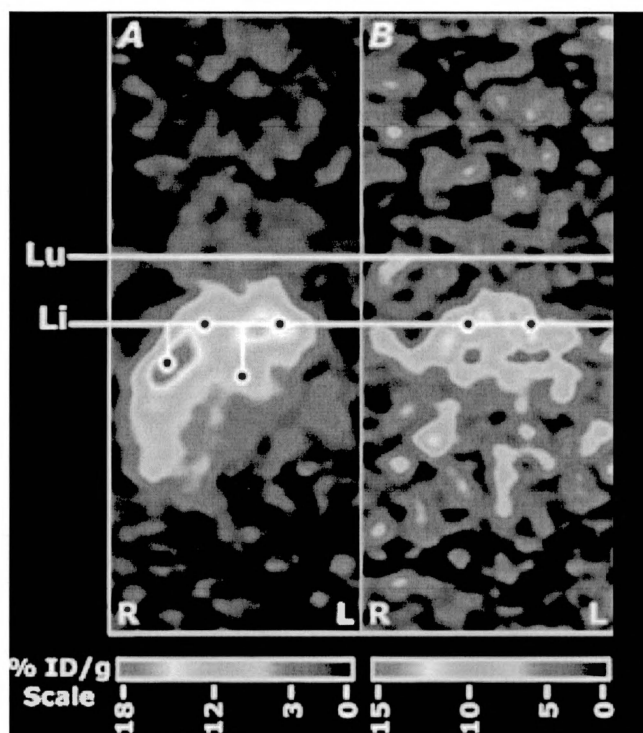


Figure 17 - Imagerie TEP avec le $[^{64}\text{Cu}]$ -PTSM (A) 6 minutes et (B) 20 heures post-injection chez la souris

Lu : poumons ; Li : foie

Image provenant de Adonai et al., 2002.

La faible captation tumorale de $[\text{Cu}]$ -PTSM observée lors de nos expériences avec des adénocarcinomes mammaires (MAC), comparativement à celle dans toutes les autres études concluantes signalées préalablement faisant intervenir d'autres types de tumeurs (MATHIAS et al., 1991; MATHIAS et al., 1994; WAHL et al., 1993), ne signifie pas nécessairement que ce traceur est non adéquat pour mesurer la perfusion sanguine tumorale avec l'imagerie TEP. En effet, la densité capillaire tumorale est très variable entre les différents types de tumeurs et il semble que les tumeurs MAC ne possèdent pas une vascularisation importante relativement à d'autres types (FOSTER et GAO, 1992; JAIN, 1988).

Alors malgré l'observation d'une faible captation du radiotracer $[^{64}\text{Cu}]\text{-PTSM}$ chez les tumeurs MAC, nous avons tout de même procédé à l'imagerie TEP en temps réel en utilisant le même protocole que celui fait avec le $[^{18}\text{F}]\text{-FDG}$, afin de vérifier s'il était possible d'observer une diminution du flot sanguin tumoral reflétant le début d'une stase vasculaire, suite à l'application de la thérapie photodynamique avec le photosensibilisateur AlPcS_4 . À la Figure 15, nous pouvons discerner un écart entre la captation du $[^{64}\text{Cu}]\text{-PTSM}$ chez les tumeurs contrôle et traitée que vers la fin du scan de 120 minutes. En effet, les deux tumeurs captent le $[^{64}\text{Cu}]\text{-PTSM}$ de façon équivalente et ce, jusqu'à la 110^e minute d'infusion continue environ, malgré l'illumination d'une des tumeurs vers la 30^e minute. Le temps d'imagerie devrait donc être prolongé d'au moins 1 heure afin de voir si l'écart de captation augmente par la suite. De plus, la précision des courbes est moindre que lorsque le $[^{18}\text{F}]\text{-FDG}$ est utilisé, car le découpage a dû être fait aux 15 min au lieu de l'être à chaque minute étant donné la faible captation tumorale du $[^{64}\text{Cu}]\text{-PTSM}$.

À l'aide d'un échantillonneur sanguin et d'un compteur lui étant relié, nous avons aussi réalisé des études sur l'élimination sanguine du radiotracer $[^{64}\text{Cu}]\text{-PTSM}$ injecté de façon continue pendant 2 heures. La Figure 16 démontre que l'équilibre dans le sang n'est atteint qu'après environ 108 minutes. L'imagerie en temps réel avec le $[^{64}\text{Cu}]\text{-PTSM}$ devrait donc débuter 2 heures après le début d'une infusion continue, puisque l'état d'équilibre est long à atteindre avec ce radiotracer.

En somme, il serait important de bien connaître la pharmacocinétique de ce radiotracer au niveau des tumeurs afin d'être en mesure de développer des protocoles d'imagerie tumorale

adéquats. En effet, le protocole en temps réel utilisé avec le [^{64}Cu]-PTSM était le même que celui mis au point pour le [^{18}F]-FDG servant à suivre les variations dans le métabolisme tumoral durant et après la TPD. Ce protocole ne semble donc pas être adapté pour l'utilisation du [^{64}Cu]-PTSM dans le but d'observer des variations dans le flot sanguin tumoral pouvant confirmer l'existence d'une stase vasculaire engendrée par les PS à action indirecte comme le AlPcS₄. D'autres études sont donc en cours afin de développer un protocole en temps réel approprié pour étudier les changements dans la perfusion tumorale induits par la TPD. En effet, les protocoles d'imagerie doivent être adaptés en fonction de la cinétique de chaque radiotraceur utilisé, ainsi qu'en fonction des processus biologiques investigués.

DISCUSSION GÉNÉRALE ET OPTIMISATION DES TRAVAUX

En médecine nucléaire clinique, l'imagerie TEP est habituellement réalisée après un temps fixe suivant l'injection d'un radiotraceur. Par exemple, les scans au [^{18}F]-FDG sont exécutés environ une heure après son injection, temps auquel ce traceur a presque atteint un état d'équilibre. À ce moment, la captation régionale représente adéquatement le niveau de métabolisme du glucose. L'imagerie dynamique, au cours de laquelle les changements dans la captation d'un radiotraceur sont mesurés dans le temps, fournit quant à elle beaucoup plus d'informations sur la physiologie sous-jacente d'un tissu et a habituellement lieu après l'injection du radiotraceur sous forme de bolus. Cette méthode d'injection est par contre limitante du fait que l'observation de changements sur une certaine période de temps devra être accompagnée d'injections additionnelles. Aussi, si ces changements sont transitoires ou trop rapides, la cinétique du traceur utilisé peut s'avérer être trop lente pour bien les étudier. En effet, la cinétique de captation du [^{18}F]-FDG étant relativement lente, une simple injection en bolus ne permet pas de mesurer instantanément le métabolisme du glucose. Alors dans le but de détecter des changements transitoires dans la captation d'un traceur, une infusion lente de ce dernier constitue la méthode de choix, puisque l'injection du traceur se fait de façon continue tout au long de l'imagerie. Des protocoles d'infusion en continu ont déjà été employés afin d'observer des changements transitoires dans le cadre d'études neurologiques où l'infusion lente d'un radio-ligand a permis d'étudier de façon dynamique les interactions ayant lieu au niveau des sites de liaison des récepteurs (ACTON et al., 2002; ENDRES et CARSON, 1998).

Ce mémoire a quant à lui traité du potentiel d'utiliser l'imagerie TEP dynamique avec une infusion continue du radiotracer [^{18}F]-FDG dans l'évaluation en temps réel de la réponse tumorale à la thérapie photodynamique chez le rat. De façon plus spécifique, le mécanisme d'action de différents photosensibilisateurs a été investigué en fonction des processus métaboliques transitoires observés durant et immédiatement après l'illumination (se référer à la section Présentation des travaux ; Article 2). Avec les photosensibilisateurs ZnPcS_2 et AlPcS_4 , connus pour agir respectivement de façon directe et indirecte sur la mort des cellules tumorales (FINGAR et al., 1993; PENG et al., 1990), nous avons donc obtenu par imagerie TEP au [^{18}F]-FDG des profils de captation significativement différents nous permettant d'identifier divers processus métaboliques transitoires et ainsi établir le type de mécanisme d'action de chacun de ces photosensibilisateurs. En effet, la TPD a occasionné tant pour le ZnPcS_2 que le AlPcS_4 une chute dans le taux de captation du [^{18}F]-FDG suivie d'une récupération partielle un certain temps après la fin de l'illumination, mais avec des profils de réponse différents. L'analyse de ces courbes temps-activité dans l'article 2 a fait ressortir plusieurs paramètres nous permettant d'identifier divers processus métaboliques transitoires se déroulant dans les tumeurs pendant et tout de suite après le traitement et ainsi établir que le photosensibilisateur ZnPcS_2 entraîne la mort des cellules tumorales directement alors que le AlPcS_4 agit plutôt indirectement en affectant leur vascularisation. Alors nos observations sont en accord avec celles de d'autres groupes ayant étudié par des méthodes plus conventionnelles les mécanismes d'action des photosensibilisateurs en thérapie photodynamique. Cette procédure d'imagerie rapide est très différente de l'emploi de méthodes conventionnelles comme l'histologie tumorale dans la discrimination des mécanismes d'action de différents photosensibilisateurs (MARGARON et al., 1996) et elle a

l'avantage de pouvoir suivre la réponse tumorale pendant le traitement et ainsi d'observer en temps réel les divers processus transitoires s'en découlant. Il est à noter que bien que le [^{18}F]-FDG soit un radiotraceur non-spécifique pouvant aussi illustrer des phénomènes d'apoptose et d'inflammation dans les tumeurs (REINHARDT et al., 1997), les différences observées dans le métabolisme tumoral durant ce protocole d'imagerie dynamique avec infusion continue du radiotraceur [^{18}F]-FDG ont clairement évoqué l'existence de deux mécanismes d'action distincts selon la classe de photosensibilisateurs utilisée.

Comme il en est mention dans l'article 2, nos résultats illustrant les changements dans le métabolisme tumoral causés par la TPD sont compatibles avec l'existence de phénomènes d'apoptose, avec l'utilisation d'un photosensibilisateur comme le ZnPcS_2 causant des dommages cellulaires via un mécanisme d'action direct, ou bien de stase vasculaire, avec un photosensibilisateur comme le AlPcS_4 causant des dommages indirectement via la destruction des vaisseaux sanguins irriguant les cellules tumorales. En effet, nous avons mentionné que le processus d'apoptose serait potentiellement impliqué dans la reprise de captation rapide et presque totale du [^{18}F]-FDG observée suite à la TPD avec le ZnPcS_2 . Toutefois, afin de vérifier en temps réel s'il s'agit bel et bien du début d'un phénomène apoptotique, il faudrait disposer d'un traceur pouvant détecter la présence d'apoptose en l'injectant de façon continue tout au long de l'imagerie et de l'illumination, comme nous l'avons fait avec le [^{18}F]-FDG. Récemment, une nouvelle technique a été développée dans notre laboratoire afin de détecter les processus apoptotiques chez la souris, mais quelques heures après l'application de la thérapie photodynamique (CAUCHON et al., 2006). Dans cette procédure comportant trois étapes, les animaux reçoivent d'abord une injection

d'annexine-V biotinée pour pré-cibler les cellules apoptotiques, suivie d'une injection d'avidine pour éliminer la biotine libre. Ensuite, l'apoptose est détectée par imagerie TEP avec un contraste élevé en injectant un complexe ^{64}Cu -DOTA-biotine-streptavidine. Des images TEP de contraste médiocre sont obtenues si on omet l'administration d'annexine-V biotinée ou bien la chasse de la biotine libre, confirmant que le pré-ciblage en trois étapes est essentiel pour détecter l'apoptose avec l'imagerie TEP. Par contre, étant donné la complexité de la méthode avec le pré-ciblage et ses multiples étapes, il serait malheureusement très difficile de la transposer à notre protocole en temps réel. Ensuite, toujours à l'aide du même protocole d'imagerie TEP en temps réel mais avec des traceurs de perfusion sanguine tels que le ^{13}N - NH_3 et le ^{64}Cu -PTSM, nous avons tenté en vain d'observer des variations dans le flot sanguin tumoral afin de démontrer l'existence du phénomène de stase vasculaire avec l'utilisation du photosensibilisateur AlPcS_4 à action indirecte. Les résultats et leur analyse se retrouvent dans la section intitulée « Imagerie TEP en temps réel du flot sanguin tumoral lors de la TPD ». D'autres études sont donc en cours afin de développer un protocole en temps réel approprié pour étudier les changements dans la perfusion tumorale induits par la TPD. En effet, les protocoles d'imagerie doivent être adaptés en fonction de la cinétique de chaque radiotracer utilisé, ainsi qu'en fonction des processus biologiques investigués. De plus, l'essai d'autres traceurs, comme le $^{18}\text{F}^-$, pourrait aussi être tenté afin de poursuivre l'application de l'imagerie en temps réel à l'étude des changements dans le flot sanguin tumoral durant la thérapie photodynamique.

PERSPECTIVES D'AVENIR

Les résultats présentés dans le cadre de ce mémoire ont démontré que l'imagerie TEP a le potentiel de fournir de l'information en temps réel sur divers processus physiologiques et métaboliques transitoires se déroulant *in vivo* suite à la thérapie photodynamique du cancer. L'obtention de valeurs quantitatives absolues reliées aux changements observés exigerait quant à elle la conception et la validation de modèles cinétiques appropriés (MORRIS et al., 2005). Le protocole utilisé d'infusion en continue des radiotraceurs fut conçu en premier lieu pour pallier aux limitations qui existent dans la mise au point de modèles pharmacocinétiques lorsqu'il y a des injections multiples de [^{18}F]-FDG en bolus (LAPOINTE et al., 1999). C'est donc à partir de nos études réalisées avec la TEP-TPD en temps réel que l'équipe du Dr Bentourkia (BENTOURKIA et al., 2006) a amorcé l'élaboration de modèles pharmacocinétiques sur le métabolisme tumoral durant la TPD. La modélisation cinétique du [^{18}F]-FDG injecté en continu a permis l'investigation d'états métaboliques transitoires en temps réel au niveau de différents compartiments tissulaires. Ces modèles sont utiles pour déterminer les moments exacts où surviennent les processus biologiques transitoires reflétés par les changements dans la captation du [^{18}F]-FDG. La modélisation cinétique au [^{18}F]-FDG permettra donc une meilleure compréhension des modes d'action de la thérapie photodynamique du cancer par l'étude des états métaboliques transitoires au niveau de plusieurs compartiments tissulaires, et l'élaboration d'autres modèles étudiant les changements dans la perfusion tumorale pourrait aussi avoir lieu avec l'utilisation du traceur [^{64}Cu]-PTSM.

La période d'imagerie dynamique avec infusion continue de [^{18}F]-FDG était limitée à deux heures dans les études discutées, mais avec un contrôle plus rigoureux des signes vitaux de l'animal, le temps d'imagerie pourrait être allongé de quelques heures. Aussi, le même protocole d'imagerie pourrait en plus avoir lieu 12 et 24 heures post-traitement. Ainsi, l'observation et l'étude de changements transitoires survenant plus tardivement au niveau de plusieurs fonctions et processus tumoraux pourraient être réalisées suite à l'application de diverses thérapies. En effet, cela pourrait permettre de mieux étudier des processus comme l'inflammation ou l'apoptose cellulaire. Aussi, les processus apoptotiques pourraient être étudiés plus rigoureusement en utilisant des traceurs spécifiques comme l'Annexine-V (GLASER et al., 2003). D'autres traceurs prometteurs comme le [^{18}F]deoxy-fluorothymidine ([^{18}F]-FLT) (SUGIYAMA et al., 2004) ou le [^{18}F]-fluoroethyltyrosine ([^{18}F]-FET) (PAULEIT et al., 2005) seraient aussi très intéressants à expérimenter dans le cadre d'un protocole d'imagerie TEP en temps réel dans le but de suivre les variations au niveau de la prolifération cellulaire ou de la synthèse protéique durant et après un traitement contre le cancer.

La dépendance à l'oxygène dans le fonctionnement de la TPD est similaire à celle dans le cas des radiations ionisantes, donc la faible concentration en oxygène dans certaines régions des tumeurs peut limiter l'efficacité de la TPD (TROMBERG et al., 1990). En effet, des études *in vitro* et *in vivo* ont établi que la toxicité photodynamique est réduite sous des conditions hypoxiques (HENDERSON et FINGAR, 1987; MITCHELL et al., 1985; MOAN et SOMMER, 1985). Étant donné que les réactions de photooxydation impliquées dans la TPD consomment de l'oxygène, il a été démontré que l'application d'une plus faible

intensité lumineuse, nommée taux de fluence, ou bien le fait de fractionner la période d'illumination peuvent grandement améliorer l'efficacité de la thérapie photodynamique en limitant le manque en oxygène (DE HAAS et al., 2006; FOSTER et al., 1991; FOSTER et al., 1993; TROMBERG et al., 1990). Il serait donc intéressant d'appliquer la méthode d'imagerie TEP en temps réel afin d'étudier dans quelle mesure différents taux de fluence influencent le métabolisme et la perfusion tumorale et ce, durant et après l'illumination.

D'autres expériences pourraient aussi impliquer l'administration conjointe de photosensibilisateurs ayant un mode d'action différent, direct et indirect, afin d'observer les effets transitoires sur le métabolisme tumoral. Peut-être qu'une telle combinaison de drogues aurait un effet de synergie sur l'efficacité thérapeutique (PENG et al., 1990). Aussi, l'emploi de la thérapie photodynamique combiné avec celui de d'autres traitements existants comme la chimiothérapie pourrait s'avérer très prometteur dans la lutte contre certains cancers. Une équipe en a déjà fait l'expérience sur des souris en combinant la thérapie photodynamique avec le photosensibilisateur ALPcS₂ et la chimiothérapie avec les drogues adriamycine ou cisplatine (CANTI et al., 1998). La combinaison des deux modalités de traitements a occasionné une augmentation significative de l'effet anti-tumoral, alors que l'administration seule de faibles doses de chimiothérapie était inefficace. La combinaison de ces protocoles thérapeutiques permet du même coup de diminuer le dosage des médicaments cytotoxiques administrés, restreignant ainsi les effets toxiques au niveau des tissus normaux du patient qui occasionnent les malheureux effets secondaires.

L'imagerie TEP dynamique avec la méthode d'infusion continue d'un radiotracer comme le [¹⁸F]-FDG pourrait aussi servir à observer les effets physiologiques transitoires se

déroulant dans des organes vitaux comme le cœur, le foie ou les reins sous un choc septique. Cette procédure pourrait également être utile pour découvrir quels sont les effets pharmacologiques précoces dans les tissus et organes suivant l'administration d'un médicament, qui sont difficiles à observer avec d'autres méthodes incluant l'imagerie conventionnelle statique à des temps sélectionnés. L'observation par imagerie dynamique TEP d'effets pharmacologiques transitoires survenant suite au traitement de rats avec de l' α -methyl-para-tyrosine (AMPT), un médicament employé dans le cas de divers désordres psychiques, a d'ailleurs été récemment rapportée (KILBOURN et al., 2005). De plus, l'application d'un protocole d'imagerie TEP avec infusion continue d'un radiotracer s'avère prometteuse dans l'étude des effets transitoires résultant des manipulations de la barrière hémato-encéphalique chez le rat (FORTIN et al., 2005; FORTIN, 2004).

CONCLUSION

Étant donné que la thérapie photodynamique engendre rapidement des effets au niveau des tumeurs traitées, il a été suggéré que l'imagerie TEP pourrait être un outil idéal dans l'étude de la réponse tumorale tôt suite au traitement. L'imagerie TEP avec le [^{18}F]-FDG s'est effectivement avérée être une méthode prometteuse dans l'étude des effets de la thérapie photodynamique du cancer *in vivo*, soit dans l'évaluation de l'efficacité d'un photosensibilisateur ou dans la détermination de son mécanisme d'action. Afin de mieux comprendre les processus biologiques transitoires impliqués dans la destruction des cellules tumorales, c'est-à-dire les processus survenant durant et immédiatement après l'illumination, nous avons développé une nouvelle approche utilisant l'imagerie TEP avec une infusion continue du radiotracer [^{18}F]-FDG afin d'évaluer en temps réel la réponse tumorale à la TPD chez le rat. De façon plus spécifique, le mécanisme d'action de différents photosensibilisateurs a été investigué en fonction des processus métaboliques transitoires observés durant et immédiatement après l'illumination.

Le suivi en temps réel avec l'imagerie TEP de la réponse tumorale suite à la TPD a effectivement mis en évidence des différences importantes au niveau des profils de captation des tumeurs reflétant l'existence de processus transitoires distincts selon le photosensibilisateur utilisé, procurant une façon rapide de faire la distinction entre un mécanisme de destruction directe ou indirecte des cellules tumorales. Tel que discuté dans le cadre de l'article 2, les deux différentes classes de photosensibilisateurs utilisées ont effectivement occasionné des profils de captation du [^{18}F]-FDG clairement distincts d'après

leur mécanisme d'action sur la tumeur. Une drogue amphiphile comme le ZnPcS_2 entraîne une chute rapide dans la captation tumorale du $[^{18}\text{F}]\text{-FDG}$ suivie d'une récupération rapide et considérable de la captation de $[^{18}\text{F}]\text{-FDG}$ lorsque l'illumination prend fin. Alors que pour une drogue hydrophile comme le AlPcS_4 , la réduction initiale ainsi que la récupération dans la captation tumorale de $[^{18}\text{F}]\text{-FDG}$ surviennent plus tardivement et de façon moins prononcée que lors de l'utilisation d'un photosensibilisateur à action directe. Ces observations ont permis de conclure, en accord avec des études plus conventionnelles réalisées antérieurement (FINGAR et al., 1993; PENG et al., 1990), que la TPD faite avec le ZnPcS_2 induit plutôt directement la mort cellulaire, alors que l'emploi du AlPcS_4 affecte en premier lieu le système vasculaire de la tumeur amenant une mort cellulaire indirecte par la suite. Même si ces études en temps réel laissent sans réponse plusieurs questions sur les mécanismes complexes de la réponse tumorale à la TPD, les différences majeures entre les processus métaboliques transitoires observés, révélés par les changements dans le taux de captation du $[^{18}\text{F}]\text{-FDG}$ ainsi que par les délais de réponse et de récupération, nous donnent la certitude de l'existence de mécanismes d'action distincts.

En plus de visualiser la réponse métabolique tumorale à la thérapie photodynamique, cette procédure d'imagerie TEP en temps réel a aussi été utilisée pour étudier de façon préliminaire les changements dans le flot sanguin tumoral pendant la TPD, et pourrait aussi être employée pour étudier des mécanismes de réponse spécifiques tels que les processus apoptotiques. L'imagerie dynamique avec infusion continue d'un traceur offre donc un potentiel intéressant pour l'étude en temps réel des changements transitoires survenant au niveau de la physiologie tumorale suite à l'application de divers traitements comme la

thérapie photodynamique du cancer. Couplée à une modélisation pharmacocinétique plus détaillée ainsi qu'à l'utilisation de traceurs spécifiques étudiant des processus tumoraux précis, cette procédure d'imagerie innovatrice offre donc le potentiel de scruter en temps réel des mécanismes d'interventions thérapeutiques, d'optimiser leur application et de prévoir leur efficacité.

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier mes directeurs de recherche, le Dr Roger Lecomte et le Dr van Lier, de m'avoir donné la chance de poursuivre mon cheminement scientifique dans un milieu de recherche stimulant. Le projet de maîtrise qu'ils m'ont confié m'a beaucoup tenu à coeur et ce mémoire est le fruit de beaucoup de travail et d'efforts. Je leur suis également très reconnaissante de m'avoir permis de participer à plusieurs conférences élargissant ainsi mes horizons scientifiques.

Un merci particulier à Jules Cadorette pour sa grande disponibilité et son indispensable aide technique ainsi qu'à Dr Jacques Rousseau pour ses multiples conseils. Merci également aux chimistes Réjean Langlois, Serge Rodrigue et René Ouellet pour la synthèse des radiotraceurs, ainsi qu'aux autres chimistes ayant synthétisé les PS utilisés dans mes études.

Merci à tous les membres du Département de médecine nucléaire et radiobiologie, spécialement à tous ceux et celles m'ayant apporté de l'aide ou véhiculé des mots d'encouragements pendant mes études graduées.

Je tiens à remercier les membres du jury, soient Dr Roger Lecomte, Dr Johan E. van Lier, Dr Éric Turcotte ainsi que Dr David Fortin, d'avoir aimablement accepté d'évaluer ce travail.

Je souhaite finalement remercier de tout mon cœur mon conjoint Jocelyn pour son soutien inconditionnel, ainsi que ma maman Diane, reposant maintenant avec les anges, qui m'a certes transmis sa force et son courage afin de m'aider à persévérer dans mon cheminement.

Merci beaucoup à tous!

Véronique

BIBLIOGRAPHIE

- ABE Y, MATSUZAWA T, FUJIWARA T, et al. Assessment of radiotherapeutic effects on experimental tumors using ^{18}F -2-fluoro-2-deoxy-D-glucose. *Eur J Nucl Med*. 1986;12:325-328.
- ABOAGYE EO, PRICE PM. Use of positron emission tomography in anticancer drug development. *Invest New Drugs*. 2003;21:169-181.
- ACTON PD, HOU C, KUNG MP, PLOSSL K, KEENEY CL, KUNG HF. Occupancy of dopamine D2 receptors in the mouse brain measured using ultra-high-resolution single-photon emission tomography and [^{123}I]IBF. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 2002;29:1507-1515.
- ADONAI N, NGUYEN KN, WALSH J, et al. Ex vivo cell labeling with ^{64}Cu -pyruvaldehyde-bis(N4-methylthiosemicarbazone) for imaging cell trafficking in mice with positron-emission tomography. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2002;99:3030-3035.
- ALI H, VAN LIER JE. Metal complexes as photo- and radiosensitizers. *Chem Rev*. 1999;99:2379-2450.
- ALI H, LANGLOIS R, WAGNER JR, BRASSEUR N, PAQUETTE B, VAN LIER JE. Biological activities of phthalocyanines--X. Syntheses and analyses of sulfonated phthalocyanines. *Photochem Photobiol*. 1988;47:713-717.
- ALLEN CM, SHARMAN WM, VAN LIER JE. Current status of phthalocyanines in the photodynamic therapy of cancer. *J Porph Phthal*. 2001;5:161-169.
- AULER H, BANZER G. Untersuchungen über die rolle der porphyrine bei geschwulstkranken menschen und tieren. *Z Krebsforsch*. 1942;53:65-68.
- BABICH JW, CHERRY SR, CARNOCHAN P, MCGUIRE J, SHARMA H. An evaluation of Cu-64 pyruvaldehyde bis (methylthiosemicarbazone) (PTSM) for the measurement of tissue perfusion. *J Nucl Med*. 1989;30:1756.
- BARTHEL H, CLEIJ MC, COLLINGRIDGE DR, et al. 3'-deoxy-3'-[^{18}F]fluorothymidine as a new marker for monitoring tumor response to antiproliferative therapy in vivo with positron emission tomography. *Cancer Res*. 2003;63:3791-3798.
- BEANLANDS RS, MUZIK O, MINTUN M, et al. The kinetics of copper-62-PTSM in the normal human heart. *J Nucl Med*. 1992;33:684-690.
- BEN-HUR E, HELDMAN E, CRANE SW, ROSENTHAL I. Release of clotting factors from photosensitized endothelial cells: A possible trigger for blood vessel occlusion by photodynamic therapy. *FEBS Lett*. 1988;236:105-108.

BENTOURKIA M, BÉRARD V, BOUBACAR P, VAN LIER JE, LECOMTE R. Kinetic modeling of FDG uptake in rat tumors during photodynamic therapy. Affiche présentée à: 2006 IEEE Medical Imaging Conference; 3 novembre, 2006; San Diego, CA.

BLANKENBERG FG. Recent advances in the imaging of programmed cell death. *Curr Pharm Des.* 2004;10:1457-1467.

BLOWER PJ, LEWIS JS, ZWEIT J. Copper radionuclides and radiopharmaceuticals in nuclear medicine. *Nucl Med Biol.* 1996;23:957-980.

BONNETT R. Photosensitizers of the porphyrin and phthalocyanine series for photodynamic therapy. *Chem Soc Rev.* 1995;24:19-33.

BOYLE RW, DOLPHIN D. Structure and biodistribution relationships of photodynamic sensitizers. *Photochem Photobiol.* 1996;64:469-485.

BOYLE RW, PAQUETTE B, VAN LIER JE. Biological activities of phthalocyanines. XIV. Effect of hydrophobic phthalimidomethyl groups on the in vivo phototoxicity and mechanism of photodynamic action of sulphonated aluminium phthalocyanines. *Br J Cancer.* 1992;65:813-817.

BRASSEUR N, LEWIS K, ROUSSEAU J, VAN LIER JE. Measurement of tumor vascular damage in mice with ^{99m}Tc -MIBI following photodynamic therapy. *Photochem Photobiol.* 1996;64:702-706.

BROWN SB, BROWN EA, WALKER I. The present and future role of photodynamic therapy in cancer treatment. *Lancet Oncol.* 2004;5:497-508.

CANTI G, NICOLIN A, CUBEDDU R, TARONI P, BANDIERAMONTE G, VALENTINI G. Antitumor efficacy of the combination of photodynamic therapy and chemotherapy in murine tumors. *Cancer Lett.* 1998;125:39-44.

CAPELLA MA, CAPELLA LS. A light in multidrug resistance: Photodynamic treatment of multidrug-resistant tumors. *J Biomed Sci.* 2003;10:361-366.

CARNOCHAN P, BROOKS R. Radiolabelled 5'-iodo-2'-deoxyuridine: A promising alternative to [^{18}F]-2-fluoro-2-deoxy-D-glucose for PET studies of early response to anticancer treatment. *Nucl Med Biol.* 1999;26:667-672.

CAUCHON N, LANGLOIS R, ROUSSEAU JA, et al. PET imaging of apoptosis with ^{64}Cu -labelled streptavidin following pretargeting of phosphatidylserine with biotinylated annexin-V. *Eur J Nucl Med Mol Imaging.* 2006; À paraître.

CECKLER TL, GIBSON SL, KENNEDY SD, HILL R, BRYANT RG. Heterogeneous tumour response to photodynamic therapy assessed by in vivo localised ^{31}P NMR spectroscopy. *Br J Cancer.* 1991;63:916-922.

- CHAIKEN L, REGE S, HOH C, et al. Positron emission tomography with fluorodeoxyglucose to evaluate tumor response and control after radiation therapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 1993;27:455-464.
- CHAN WS, BRASSEUR N, LA MADELEINE C, OUELLET R, VAN LIER JE. Efficacy and mechanism of aluminium phthalocyanine and its sulphonated derivatives mediated photodynamic therapy on murine tumours. *Eur J Cancer*. 1997;33:1855-1859.
- CHAN WS, BRASSEUR N, LA MADELEINE C, VAN LIER JE. Evidence for different mechanisms of EMT-6 tumor necrosis by photodynamic therapy with disulfonated aluminum phthalocyanine or photofrin: Tumor cell survival and blood flow. *Anticancer Res*. 1996;16:1887-1892.
- CHATZIIOANNOU AF. PET scanners dedicated to molecular imaging of small animal models. *Mol Imaging Biol*. 2002;4:47-63.
- CHELI R, ADDIS F, MORTELLARO CM, FONDA D, CUBEDDU R. Photodynamic therapy of spontaneous animal tumors using the active component of hematoporphyrin derivative (DHE) as photosensitizing drug: Clinical results. *Cancer Lett*. 1987;38:101-105.
- CHERRY SR, GAMBHIR SS. Use of positron emission tomography in animal research. *ILAR J*. 2001;42:219-232.
- DE HAAS ER, KRUIJT B, STERENBORG HJ, MARTINO NEUMANN HA, ROBINSON DJ. Fractionated illumination significantly improves the response of superficial basal cell carcinoma to aminolevulinic acid photodynamic therapy. *J Invest Dermatol [En ligne]*. 2006.
- DELANEY TF, SINDELAR WF, TOCHNER Z, et al. Phase I study of debulking surgery and photodynamic therapy for disseminated intraperitoneal tumors. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 1993;25:445-457.
- DEROSA MC, CRUTCHLEY RJ. Photosensitized singlet oxygen and its applications. *Coordination Chemistry Reviews*. 2002;233-234:351-371.
- DETTY MR, GIBSON SL, WAGNER SJ. Current clinical and preclinical photosensitizers for use in photodynamic therapy. *J Med Chem*. 2004;47:3897-3915.
- DIAMOND I, GRANELLI SG, MCDONAGH AF, NIELSEN S, WILSON CB, JAENICKE R. Photodynamic therapy of malignant tumours. *Lancet*. 1972;2:1175-1177.
- DOUGHERTY TJ. An update on photodynamic therapy applications. *J Clin Laser Med Surg*. 2002;20:3-7.
- DOUGHERTY TJ, GOMER CJ, HENDERSON BW, et al. Photodynamic therapy. *J Natl Cancer Inst*. 1998;90:889-905.

- DOUGHERTY TJ. Photosensitizers: Therapy and detection of malignant tumors. *Photochem Photobiol.* 1987;45:879-889.
- ENDRES CJ, CARSON RE. Assessment of dynamic neurotransmitter changes with bolus or infusion delivery of neuroreceptor ligands. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1998;18:1196-1210.
- EUSTACHE F, DESGRANGES B, PETIT-TABOUE MC, et al. Transient global amnesia: Implicit/explicit memory dissociation and PET assessment of brain perfusion and oxygen metabolism in the acute stage. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 1997;63:357-367.
- FINGAR VH. Vascular effects of photodynamic therapy. *J Clin Laser Med Surg.* 1996;14:323-328.
- FINGAR VH, WIEMAN TJ, KARAVOLOS PS, DOAK KW, OUELLET R, VAN LIER JE. The effects of photodynamic therapy using differently substituted zinc phthalocyanines on vessel constriction, vessel leakage and tumor response. *Photochem Photobiol.* 1993;58:251-258.
- FISHER AM, MURPHREE AL, GOMER CJ. Clinical and preclinical photodynamic therapy. *Lasers Surg Med.* 1995;17:2-31.
- FOOTE CS. Definition of type I and type II photosensitized oxidation. *Photochem Photobiol.* 1991;54:659.
- FORTIN D, DESJARDINS A, BENKO A, NIYONSEGA T, BOUDRIAS M. Enhanced chemotherapy delivery by intraarterial infusion and blood-brain barrier disruption in malignant brain tumors: The Sherbrooke experience. *Cancer.* 2005;103:2606-2615.
- FORTIN D. The blood-brain barrier should not be underestimated in neuro-oncology. *Rev Neurol (Paris).* 2004;160:523-532.
- FOSTER TH, HARTLEY DF, NICHOLS MG, HILF R. Fluence rate effects in photodynamic therapy of multicell tumor spheroids. *Cancer Res.* 1993;53:1249-1254.
- FOSTER TH, GAO L. Dosimetry in photodynamic therapy: Oxygen and the critical importance of capillary density. *Radiat Res.* 1992;130:379-383.
- FOSTER TH, MURANT RS, BRYANT RG, KNOX RS, GIBSON SL, HILF R. Oxygen consumption and diffusion effects in photodynamic therapy. *Radiat Res.* 1991;126:296-303.
- GIROTTI AW. Photodynamic lipid peroxidation in biological systems. *Photochem Photobiol.* 1990;51:497-509.
- GLASER M, COLLINGRIDGE DR, ABOAGYE EO, et al. Iodine-124 labelled annexin-V as a potential radiotracer to study apoptosis using positron emission tomography. *Appl Radiat Isot.* 2003;58:55-62.

- GREEN MA, MATHIAS CJ, WELCH MJ, et al. Copper-62-labeled pyruvaldehyde bis(N4-methylthiosemicarbazonato)copper(II): Synthesis and evaluation as a positron emission tomography tracer for cerebral and myocardial perfusion. *J Nucl Med*. 1990;31:1989-1996.
- GRONROOS T, BENTZEN L, MARJAMAKI P, et al. Comparison of the biodistribution of two hypoxia markers [^{18}F]FETNIM and [^{18}F]FMISO in an experimental mammary carcinoma. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 2004;31:513-520.
- HAUSMANN W. Die sensibilisierende wirkung des hamatoporphyrins. *Biochem Zeit*. 1911;30:276-316.
- HAWKINS RA, PHELPS ME. PET in clinical oncology. *Cancer Metastasis Rev*. 1988;7:119-142.
- HENDERSON BW, DOUGHERTY TJ. How does photodynamic therapy work? *Photochem Photobiol*. 1992;55:145-157.
- HENDERSON BW, FINGAR VH. Relationship of tumor hypoxia and response to photodynamic treatment in an experimental mouse tumor. *Cancer Res*. 1987;47:3110-3114.
- HENDERSON BW, WALDOW SM, MANG TS, POTTER WR, MALONE PB, DOUGHERTY TJ. Tumor destruction and kinetics of tumor cell death in two experimental mouse tumors following photodynamic therapy. *Cancer Res*. 1985;45:572-576.
- HENDREN SK, HAHN SM, SPITZ FR, et al. Phase II trial of debulking surgery and photodynamic therapy for disseminated intraperitoneal tumors. *Ann Surg Oncol*. 2001;8:65-71.
- HERSCHMAN HR. Micro-PET imaging and small animal models of disease. *Curr Opin Immunol*. 2003;15:378-384.
- HOVE JD, KOFOED KF, WU HM, et al. Simultaneous cardiac output and regional myocardial perfusion determination with PET and nitrogen 13 ammonia. *J Nucl Cardiol*. 2003;10:28-33.
- IYER M, BARRIO JR, NAMAVARI M, et al. 8- ^{18}F fluoropenciclovir: An improved reporter probe for imaging HSV1-TK reporter gene expression in vivo using PET. *J Nucl Med*. 2001;42:96-105.
- JAIN RK. Determinants of tumor blood flow: A review. *Cancer Res*. 1988;48:2641-2658.
- JOHN EK, GREEN MA. Structure-activity relationships for metal-labeled blood flow tracers: Comparison of keto aldehyde bis(thiosemicarbazonato)copper(II) derivatives. *J Med Chem*. 1990;33:1764-1770.
- JORI G, REDDI E. The role of lipoproteins in the delivery of tumour-targeting photosensitizers. *Int J Biochem*. 1993;25:1369-1375.

- JORI G. In vivo transport and pharmacokinetic behavior of tumour photosensitizers. *CIBA Found Symp.* 1989;146:78-86; discussion 86-94.
- KELLY JF, SNELL ME. Hematoporphyrin derivative: A possible aid in the diagnosis and therapy of carcinoma of the bladder. *J Urol.* 1976;115:150-151.
- KESSEL D, THOMPSON P, SAATIO K, NANTWI KD. Tumor localization and photosensitization by sulfonated derivatives of tetraphenylporphine. *Photochem Photobiol.* 1987;45:787-790.
- KILBOURN MR, BUTCH E, SHERMAN P, DESMOND T, FREY K. Dynamic microPET imaging reveals transient drug effects [abstract]. *Mol Imaging Biol.* 2005;7:106-Abstract 98.
- KONGSHAUG M. Distribution of tetrapyrrole photosensitizers among human plasma proteins. *Int J Biochem.* 1992;24:1239-1265.
- KORBELIK M, KROSL G. Enhanced macrophage cytotoxicity against tumor cells treated with photodynamic therapy. *Photochem Photobiol.* 1994;60:497-502.
- KRAMMER B. Vascular effects of photodynamic therapy. *Anticancer Res.* 2001;21:4271-4277.
- KROSL G, KORBELIK M, DOUGHERTY GJ. Induction of immune cell infiltration into murine SCCVII tumour by photofrin-based photodynamic therapy. *Br J Cancer.* 1995;71:549-555.
- LAPOINTE D, BRASSEUR N, CADORETTE J, et al. High-resolution PET imaging for in vivo monitoring of tumor response after photodynamic therapy in mice. *J Nucl Med.* 1999;40:876-882.
- LECOMTE R, BENTOURKIA M, BÉNARD F. Tomographie d'émission par positrons en oncologie. *La Physique au Canada.* 2002;58:109-117.
- LECOMTE R, CADORETTE J, RICHARD P, RODRIGUE S, ROULEAU D. Design and engineering aspects of a high resolution positron tomograph for small animal imaging. *IEEE Trans Nucl Sci.* 1994;41:1446-1452.
- LEWIS J, LAFOREST R, BUETTNER T, et al. Copper-64-diacetyl-bis(N4-methylthiosemicarbazone): An agent for radiotherapy. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2001;98:1206-1211.
- LI WW. Tumor angiogenesis: Molecular pathology, therapeutic targeting, and imaging. *Acad Radiol.* 2000;7:800-811.
- MACDONALD IJ, DOUGHERTY TJ. Basic principles of photodynamic therapy. *J Porph Phthal.* 2001;5:105-129.

- MARGARON P, MADARNAS P, OUELLET R, VAN LIER JE. Biological activities of phthalocyanines. XVII Histopathologic evidence for different mechanisms of EMT-6 tumor necrosis induced by photodynamic therapy with disulfonated aluminum phthalocyanine or photofrin. *Anticancer Res.* 1996;16:613-620.
- MATHIAS CJ, GREEN MA, MORRISON WB, KNAPP DW. Evaluation of Cu-PTSM as a tracer of tumor perfusion: Comparison with labeled microspheres in spontaneous canine neoplasms. *Nucl Med Biol.* 1994;21:83-87.
- MATHIAS CJ, WELCH MJ, PERRY DJ, et al. Investigation of copper-PTSM as a PET tracer for tumor blood flow. *Int J Rad Appl Instrum B.* 1991;18:807-811.
- MATHIAS CJ, WELCH MJ, RAICHLE ME, et al. Evaluation of a potential generator-produced PET tracer for cerebral perfusion imaging: Single-pass cerebral extraction measurements and imaging with radiolabeled Cu-PTSM. *J Nucl Med.* 1990;31:351-359.
- MAZIERE JC, MORLIERE P, SANTUS R. The role of the low density lipoprotein receptor pathway in the delivery of lipophilic photosensitizers in the photodynamic therapy of tumours. *J Photochem Photobiol B.* 1991;8:351-360.
- MILANESI C, ZHOU C, BIOLO R, JORI G. Zn(II)-phthalocyanine as a photodynamic agent for tumours. II. Studies on the mechanism of photosensitised tumour necrosis. *Br J Cancer.* 1990;61:846-850.
- MITCHELL JB, MCPHERSON S, DEGRAFF W, GAMSON J, ZABELL A, RUSSO A. Oxygen dependence of hematoporphyrin derivative-induced photoinactivation of chinese hamster cells. *Cancer Res.* 1985;45:2008-2011.
- MOAN J, PENG Q. An outline of the hundred-year history of PDT. *Anticancer Res.* 2003;23:3591-3600.
- MOAN J, SOMMER S. Oxygen dependence of the photosensitizing effect of hematoporphyrin derivative in NHK 3025 cells. *Cancer Res.* 1985;45:1608-1610.
- MOORE JV, WALLER ML, ZHAO S, et al. Feasibility of imaging photodynamic injury to tumours by high-resolution positron emission tomography. *Eur J Nucl Med.* 1998;25:1248-1254.
- MOORE JV, WEST CM, WHITEHURST C. The biology of photodynamic therapy. *Phys Med Biol.* 1997;42:913-935.
- MORRIS ED, YODER KK, WANG C, et al. ntPET: A new application of PET imaging for characterizing the kinetics of endogenous neurotransmitter release. *Mol Imaging.* 2005;4:473-489.
- MOSA M, ZITKO M, POUCKOVA P. Distribution and photodynamic effect of zinc phthalocyanine disulfonate in nude mice bearing mammary carcinoma. *Neoplasma.* 1997;44:178-183.

- MYERS R. The biological application of small animal PET imaging. *Nucl Med Biol.* 2001;28:585-593.
- NELSON JS, LIAW LH, ORENSTEIN A, ROBERTS WG, BERNS MW. Mechanism of tumor destruction following photodynamic therapy with hematoporphyrin derivative, chlorin, and phthalocyanine. *J Natl Cancer Inst.* 1988;80:1599-1605.
- OLEINICK NL, EVANS HH. The photobiology of photodynamic therapy: Cellular targets and mechanisms. *Radiat Res.* 1998;150:S146-56.
- PAULEIT D, STOFFELS G, SCHADEN W, et al. PET with O-(2-¹⁸F-fluoroethyl)-L-tyrosine in peripheral tumors: First clinical results. *J Nucl Med.* 2005;46:411-416.
- PEASTON AE, LEACH MW, HIGGINS RJ. Photodynamic therapy for nasal and aural squamous cell carcinoma in cats. *J Am Vet Med Assoc.* 1993;202:1261-1265.
- PENG Q, MOAN J. Correlation of distribution of sulphonated aluminium phthalocyanines with their photodynamic effect in tumour and skin of mice bearing CaD2 mammary carcinoma. *Br J Cancer.* 1995;72:565-574.
- PENG Q, MOAN J, FARRANTS G, DANIELSEN HE, RIMINGTON C. Localization of potent photosensitizers in human tumor LOX by means of laser scanning microscopy. *Cancer Lett.* 1991;58:17-27.
- PENG Q, MOAN J, NESLAND JM, RIMINGTON C. Aluminum phthalocyanines with asymmetrical lower sulfonation and with symmetrical higher sulfonation: A comparison of localizing and photosensitizing mechanism in human tumor LOX xenografts. *Int J Cancer.* 1990;46:719-726.
- PHELPS ME. Positron emission tomography provides molecular imaging of biological processes. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2000;97:9226-9233.
- PIO BS, PARK CK, PIETRAS R, et al. Usefulness of 3'-[F-18]fluoro-3'-deoxythymidine with positron emission tomography in predicting breast cancer response to therapy. *Mol Imaging Biol.* 2006;8:36-42.
- POGUE BW, BRAUN RD, LANZEN JL, ERICKSON C, DEWHIRST MW. Analysis of the heterogeneity of pO₂ dynamics during photodynamic therapy with verteporfin. *Photochem Photobiol.* 2001;74:700-706.
- QLT INC. Photofrin®. Disponible à l'URL : <http://www.qlt-pdt.com/Qtinc/main/mainpages.cfm?InternetPageID=69>. Consulté le 15 août 2006.
- REED MW, WIEMAN TJ, SCHUSCHKE DA, TSENG MT, MILLER FN. A comparison of the effects of photodynamic therapy on normal and tumor blood vessels in the rat microcirculation. *Radiat Res.* 1989;119:542-552.

- REINHARDT MJ, KUBOTA K, YAMADA S, IWATA R, YAEGASHI H. Assessment of cancer recurrence in residual tumors after fractionated radiotherapy: A comparison of fluorodeoxyglucose, L-methionine and thymidine. *J Nucl Med.* 1997;38:280-287.
- RIGO P, PAULUS P, KASCHTEN BJ, et al. Oncological applications of positron emission tomography with fluorine-18 fluorodeoxyglucose. *Eur J Nucl Med.* 1996;23:1641-1674.
- ROSENTHAL I. Phthalocyanines as photodynamic sensitizers. *Photochem Photobiol.* 1991;53:859-870.
- SAHA GB, MACINTYRE WJ, GO RT. Radiopharmaceuticals for brain imaging. *Semin Nucl Med.* 1994;24:324-349.
- SHARMAN WM, ALLEN CM, VAN LIER JE. Role of activated oxygen species in photodynamic therapy. *Methods Enzymol.* 2000;319:376-400.
- SHARMAN WM, ALLEN CM, VAN LIER JE. Photodynamic therapeutics: Basic principles and clinical applications. *Drug Discov Today.* 1999;4:507-517.
- SHELTON ME, GREEN MA, MATHIAS CJ, WELCH MJ, BERGMANN SR. Assessment of regional myocardial and renal blood flow with copper-PTSM and positron emission tomography. *Circulation.* 1990;82:990-997.
- SHELTON ME, GREEN MA, MATHIAS CJ, WELCH MJ, BERGMANN SR. Kinetics of copper-PTSM in isolated hearts: A novel tracer for measuring blood flow with positron emission tomography. *J Nucl Med.* 1989;30:1843-1847.
- SLATES R, CHERRY S, BOUTEFNOUCHET A, SHAO Y, DAHLBOM M, FARAHANI K. Design of a small animal MR compatible PET scanner. Anonymous Medical Imaging Conference, 12-14 Nov. 199806/Toronto, Ont., CanadaIEEE1999;46:565-70.
- SMITH TA. FDG uptake, tumour characteristics and response to therapy: A review. *Nucl Med Commun.* 1998;19:97-105.
- SOCIÉTÉ CANADIENNE DU CANCER. Statistiques canadiennes sur le cancer 2006. Disponible à l'URL : http://www.cancer.ca/vgn/images/portal/cit_86755361/31/22/935505932cw_2006stats_fr.pdf.pdf. Consulté le 2 septembre 2006.
- STAR WM, MARIJNISSEN HP, VAN DEN BERG-BLOK AE, VERSTEEG JA, FRANKEN KA, REINHOLD HS. Destruction of rat mammary tumor and normal tissue microcirculation by hematoporphyrin derivative photoradiation observed in vivo in sandwich observation chambers. *Cancer Res.* 1986;46:2532-2540.
- SUGIYAMA M, SAKAHARA H, SATO K, et al. Evaluation of 3'-deoxy-3'-¹⁸F-fluorothymidine for monitoring tumor response to radiotherapy and photodynamic therapy in mice. *J Nucl Med.* 2004;45:1754-1758.

- SUNDARESAN G, YAZAKI PJ, SHIVELY JE, et al. ^{124}I -labeled engineered anti-CEA minibodies and diabodies allow high-contrast, antigen-specific small-animal PET imaging of xenografts in athymic mice. *J Nucl Med.* 2003;44:1962-1969.
- TATSUMI M, NAKAMOTO Y, TRAUGHER B, MARSHALL LT, GESCHWIND JF, WAHL RL. Initial experience in small animal tumor imaging with a clinical positron emission tomography/computed tomography scanner using 2-[F-18]fluoro-2-deoxy-D-glucose. *Cancer Res.* 2003;63:6252-6257.
- TOWNSEND DW, BEYER T, KINAHAN PE, et al. The SMART scanner: A combined PET/CT tomograph for clinical oncology. Anonymous 1998 IEEE Nuclear Science Symposium Conference Record, 8-14 Nov. 1998 Toronto, Ont., Canada IEEE 1998;2:1170-4.
- TROMBERG BJ, ORENSTEIN A, KIMEL S, et al. In vivo tumor oxygen tension measurements for the evaluation of the efficiency of photodynamic therapy. *Photochem Photobiol.* 1990;52:375-385.
- VALLÉS A. HpD and second generation photosensitisers for the photodynamic therapy of cancer. *Afinidad.* 1993;448:469-479.
- VAN LIER JE, SPIKES JD. The chemistry, photophysics and photosensitizing properties of phthalocyanines. *CIBA Found Symp.* 1989;146:17-26; discussion 26-32.
- VON TAPPEINER H, JODLBAUER A. Ueber die wirkung der photodynamischen (fluoreszierenden) stoffe auf protozoen und enzyme. *Arch Klin Med.* 1904;80:427-487.
- WAHL RL, ZASADNY K, KOEPPE RA, et al. Initial evaluation of Cu-62 PTSM as a tumor blood-flow agent in man - Comparison studies with O-15 water. *J Nucl Med.* 1993;34:224-225.
- WAHL RL, HENRY CA, ETHIER SP. Serum glucose: Effects on tumor and normal tissue accumulation of 2-[F-18]-fluoro-2-deoxy-D-glucose in rodents with mammary carcinoma. *Radiology.* 1992;183:643-647.
- WALLHAUS TR, LACY J, STEWART R, et al. Copper-62-pyruvaldehyde bis(N-methylthiosemicarbazone) PET imaging in the detection of coronary artery disease in humans. *J Nucl Cardiol.* 2001;8:67-74.
- WALLHAUS TR, LACY J, WHANG J, GREEN MA, NICKLES RJ, STONE CK. Human biodistribution and dosimetry of the PET perfusion agent copper-62-PTSM. *J Nucl Med.* 1998;39:1958-1964.
- WARBURG O. On the origin of cancer cells. *Science.* 1956;123:309-314.
- WEBER B, WESTERGAARD G, TREYER V, BURGER C, KHAN N, BUCK A. Constant-infusion H_2^{15}O PET and acetazolamide challenge in the assessment of cerebral perfusion status. *J Nucl Med.* 2004;45:1344-1350.

- WEBER G. Carbohydrate metabolism in cancer cells and the molecular correlation concept. *Naturwissenschaften*. 1968;55:418-429.
- WEBER WA, SCHWAIGER M, AVRIL N. Quantitative assessment of tumor metabolism using FDG-PET imaging. *Nucl Med Biol*. 2000;27:683-687.
- WEISHAUP T KR, GOMER CJ, DOUGHERTY TJ. Identification of singlet oxygen as the cytotoxic agent in photoinactivation of a murine tumor. *Cancer Res*. 1976;36:2326-2329.
- WEISSLEDER R, MAHMOOD U. Molecular imaging. *Radiology*. 2001;219:316-333.
- WIEMAN TJ, MANG TS, FINGAR VH, et al. Effect of photodynamic therapy on blood flow in normal and tumor vessels. *Surgery*. 1988;104:512-517.
- WOHRLE D, HIRTH A, BOGDAHN-RAI T, SCHNURPFEIL G, SHOPOVA M. Photodynamic therapy of cancer: Second and third generations of photosensitizers. *Russ Chem Bull*. 1998;47:807-816.
- WU JC, INUBUSHI M, SUNDARESAN G, SCHELBERT HR, GAMBHIR SS. Positron emission tomography imaging of cardiac reporter gene expression in living rats. *Circulation*. 2002;106:180-183.
- XIANGSONG Z, CHANGHONG L, WEIAN C, DONG Z. PET imaging of cerebral astrocytoma with ^{13}N -ammonia. *J Neurooncol*. 2006;78:145-151.
- YAMAMOTO N, HOOBER JK, YAMAMOTO N, YAMAMOTO S. Tumoricidal capacities of macrophages photodynamically activated with hematoporphyrin derivative. *Photochem Photobiol*. 1992;56:245-250.
- YOSHIOKA T, TAKAHASHI H, OIKAWA H, et al. Influence of chemotherapy on FDG uptake by human cancer xenografts in nude mice. *J Nucl Med*. 1997;38:714-717.
- YU G, DURDURAN T, ZHOU C, et al. Noninvasive monitoring of murine tumor blood flow during and after photodynamic therapy provides early assessment of therapeutic efficacy. *Clin Cancer Res*. 2005;11:3543-3552.
- ZHOU CN. Mechanisms of tumor necrosis induced by photodynamic therapy. *J Photochem Photobiol B*. 1989;3:299-318.

ANNEXES

Annexe 1

Protocole expérimental TPD en temps réel : Imagerie tumorale du métabolisme avec le [^{18}F]-FDG

(Version : 1.3; Date : 7 mars 2003)

A1 – Fait par : Véronique Bérard	A3 - # Rat :
A2 - Date :	A4 - Poids :

√ MATÉRIEL :

- 1) ☐ Rat Fisher Femelle, ~150 g, portant 2 tumeurs MAC (longueur = 14,4-15,1 mm; largeur = 9,8-11,9 mm; épaisseur = 7,6-8,2 mm) au niveau du thorax, dans le même plan que le cœur
- 2) ☐ 1 Pompe à injection
- 3) ☐ 1 Seringue 3 ml
- 4) ☐ 1 Papillon 25G short (ligne veineuse)
- 5) ☐ [^{18}F]-FDG
- 6) ☐ Saline physiologique héparinée

PROCÉDURE :

[Hrs –0 :20] Préparation

- 1) ☐ Identifier, peser le rat, remplir les cases 1 à 4 du présent formulaire
- 2) ☐ Endormir le rat sous Isoflurane à 2,5 % avec 1,5 L/min O₂
- 3) ☐ Installer une ligne veineuse 25G short
- 4) ☐ Placer l'animal en position dorsale sur le lit de la caméra TEP
- 5) ☐ Positionner l'animal pour que les tumeurs soient dans le champ de la caméra (avec le laser de positionnement)

[Hrs 0 :00] Imagerie du métabolisme tumoral en temps réel lors de la TPD

- 6) ☐ Préparer le programme d'acquisition dynamique FDG sur la caméra TEP (120 min)
- 7) ☐ Préparer la pompe à injection automatique
Seringue de 0,96 ml (débit de 0,008 ml/min)
- 8) ☐ Prélever 6 mCi de [^{18}F]-FDG et compléter à 1,08 ml avec saline
- 9) ☐ Mesurer la radioactivité dans la seringue:
DOSE _____ Heure _____ (PRINT)
- 10) ☐ Installer la seringue de [^{18}F]-FDG sur la ligne veineuse
- 11) ☐ Remplir la canule du papillon avec le [^{18}F]-FDG (constituant le volume mort de 0,12 ml)
- 12) ☐ Lancer l'acquisition, puis l'injection continue de [^{18}F]-FDG (activer la pompe à injection) en même temps
- 13) ☐ Faire une acquisition TEP dynamique de 120 minutes ; procéder à l'illumination (TPD) de la tumeur pendant 33 minutes (si taux de fluence de 200 mW/cm^2) à partir de la 30^e minute d'acquisition TEP (c'est-à-dire 24h post-injection du photosensibilisateur ZnPcS_2 à $1 \mu\text{mol/kg}$ ou AlPcS_4 à $7,2 \mu\text{mol/kg}$ dans un volume total de 1ml/100g de poids corporel)

Pendant l'acquisition:

- 14) ☐ Noter les paramètres vitaux aux 10 minutes

[Hrs 120 :00] Fin de la séance d'imagerie TEP

- 15) ☐ Compter l'activité restante dans la seringue de [^{18}F]-FDG et dans le papillon
 - 16) ☐ Retirer l'animal de la caméra et procéder à la phase de réveil
 - 17) ☐ Nettoyer le lit de la caméra et les sondes biologiques
-

Annexe 2

Protocole expérimental TPD en temps réel : Imagerie tumorale de la perfusion avec le [^{13}N]- NH_3

(Version : 1.1; Date : 10 août 2004)

A1 – Fait par : Véronique Bérard	A3 - # Rat :
A2 - Date :	A4 - Poids :

✓ **MATÉRIEL :**

- 1) ☐ Rat Fisher Femelle, ~150 g, portant 2 tumeurs MAC (longueur = 14,4-15,1 mm; largeur = 9,8-11,9 mm; épaisseur = 7,6-8,2 mm) au niveau du thorax, dans le même plan que le cœur
- 2) ☐ 1 Pompe à injection
- 3) ☐ 2 Seringues (1 ml et 3 ml)
- 4) ☐ 1 Papillon 25G short (ligne veineuse)
- 5) ☐ [^{13}N]- NH_3
- 6) ☐ Saline physiologique héparinée

PROCÉDURE :

[Hrs –0 :20] Préparation

- 1) ☐ Identifier, peser le rat, remplir les cases 1 à 4 du présent formulaire
- 2) ☐ Endormir le rat sous Isoflurane à 2,5 % avec 1,5 L/min O_2
- 3) ☐ Installer une ligne veineuse 25G short
- 4) ☐ Placer l'animal en position dorsale sur le lit de la caméra TEP
- 5) ☐ Positionner l'animal pour que les tumeurs soient dans le champ de la caméra (avec le laser de positionnement)

[Hrs 0 :00] Imagerie de la perfusion tumorale en temps réel lors de la TPD

- 6) ☐ Préparer le programme d'acquisition dynamique NH_3 sur la caméra TEP (90 minutes)
- 7) ☐ Prélever ~ 16 mCi de $[\text{}^{13}\text{N}]\text{-NH}_3$ pour la 1^{ère} injection en continu sur un total de 2; compléter à 1,0 ml avec de la saline
- 8) ☐ Mesurer la radioactivité dans la seringue:
DOSE _____ Heure _____ (PRINT)
- 9) ☐ Installer la seringue de $[\text{}^{13}\text{N}]\text{-NH}_3$ sur la ligne veineuse
- 10) ☐ Remplir de $[\text{}^{13}\text{N}]\text{-NH}_3$ la canule du papillon + le bouchon (volume mort $\sim 0,12$ ml)
- 11) ☐ Lancer l'acquisition, puis l'injection continue de $[\text{}^{13}\text{N}]\text{-NH}_3$ en même temps (activer la pompe à injection programmée pour seringue de 0,88 ml; débit de 0,025 ml/min)
- 12) ☐ Faire une acquisition TEP dynamique de 90 minutes; procéder à l'illumination (TPD) de la tumeur pendant 30 minutes (si taux de fluence de 200 mW/cm^2) à partir de la 20^e minute d'acquisition TEP (c'est-à-dire 24h post-injection du photosensibilisateur Photofrin à 5 mg/kg dans un volume total de 1ml/100g de poids corporel)
- 13) ☐ Prélever 1,5 ml de $[\text{}^{13}\text{N}]\text{-NH}_3$ pour la 2^e injection en continu sur un total de 2 (~ 40 mCi si possible); compléter avec de la saline si nécessaire
- 14) ☐ Mesurer la radioactivité dans la seringue:
DOSE _____ Heure _____ (PRINT)
- 15) ☐ Vers la 35^e minute d'acquisition, remplacer la 1^{ère} seringue de $[\text{}^{13}\text{N}]\text{-NH}_3$ par celle de 1,5 ml; injecter 0,12ml à la main pour remplir la canule + bouchon avec le nouveau $[\text{}^{13}\text{N}]\text{-NH}_3$; activer la pompe pour la 2^e injection en continu (seringue de 1,38 ml; débit de 0,025 ml/min)
- 16) ☐ Poursuivre l'acquisition encore 55 minutes (total : 90 minutes)

Pendant l'acquisition:

- 17) ☐ Noter les paramètres vitaux aux 10 minutes

[Hrs 120 :00] Fin de la séance d'imagerie TEP

- 18) ☐ Retirer l'animal de la caméra et procéder à la phase de réveil
 - 19) ☐ Nettoyer le lit de la caméra et les sondes biologiques
-

Annexe 3

Protocole expérimental TPD en temps réel : Imagerie tumorale de la perfusion avec le [^{64}Cu]-PTSM

(Version : 1.1; Date : 15 septembre 2004)

A1 – Fait par : Véronique Bérard	A3 - # Rat :
A2 - Date :	A4 - Poids :

√ MATÉRIEL :

- 1) ☐ Rat Fisher Femelle, ~150 g, portant 2 tumeurs MAC (longueur = 14,4-15,1 mm; largeur = 9,8-11,9 mm; épaisseur = 7,6-8,2 mm) au niveau du thorax, dans le même plan que le cœur
- 2) ☐ 1 Pompe à injection
- 3) ☐ 1 Seringue 3 ml
- 4) ☐ 1 Papillon 25G short (ligne veineuse)
- 5) ☐ [^{64}Cu]-PTSM
- 6) ☐ Saline physiologique héparinée

PROCÉDURE :

[Hrs –0 :20] Préparation

- 1) ☐ Identifier, peser le rat, remplir les cases 1 à 4 du présent formulaire
- 2) ☐ Endormir le rat sous Isoflurane à 2,5 % avec 1,5 L/min O₂
- 3) ☐ Installer une ligne veineuse 25G short
- 4) ☐ Placer l'animal en position dorsale sur le lit de la caméra TEP
- 5) ☐ Positionner l'animal pour que les tumeurs soient dans le champ de la caméra (avec le laser de positionnement)

[Hrs 0 :00] Imagerie de la perfusion tumorale en temps réel lors de la TPD

- 6) ☐ Préparer le programme d'acquisition dynamique PTSM sur la caméra TEP (120 minutes)
- 7) ☐ Préparer la pompe à injection automatique
Seringue de 0,96 ml (débit de 0,008 ml/min)
- 8) ☐ Prélever 4 mCi de [^{64}Cu]-PTSM et compléter à 1,08 ml avec saline
- 9) ☐ Mesurer la radioactivité dans la seringue:
DOSE _____ Heure _____ (PRINT)
- 10) ☐ Installer la seringue de [^{64}Cu]-PTSM sur la ligne veineuse
- 11) ☐ Remplir la canule du papillon avec le [^{64}Cu]-PTSM (constituant le volume mort de 0,12 ml)
- 12) ☐ Lancer l'acquisition, puis l'injection continue de [^{64}Cu]-PTSM (activer la pompe à injection) en même temps
- 13) ☐ Faire une acquisition TEP dynamique de 120 minutes ; procéder à l'illumination (TPD) de la tumeur pendant 33 minutes (si taux de fluence de 200 mW/cm^2) à partir de la 30^e minute d'acquisition TEP (c'est-à-dire 24h post-injection du photosensibilisateur AlPcS₄ à $7,2 \mu\text{mol/kg}$ dans un volume total de 1ml/100g de poids corporel)

Pendant l'acquisition:

- 14) ☐ Noter les paramètres vitaux aux 10 minutes

[Hrs 120 :00] Fin de la séance d'imagerie TEP

- 15) ☐ Compter l'activité restante dans la seringue de [^{64}Cu]-PTSM et dans le papillon
 - 16) ☐ Retirer l'animal de la caméra et procéder à la phase de réveil
 - 17) ☐ Nettoyer le lit de la caméra et les sondes biologiques
-